

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	Bc. Markéta Vymětalíková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2022

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Markéta Vymětalíková
Název práce:	Vliv deficiencie vybraných světlosběrných komplexů a PsbS proteinu na průběh listové senescence <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů, Katedra biofyziky
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2022
Abstrakt:	Diplomová práce se zabývá vlivem deficiencie vybraných světlosběrných komplexů (lhcb) a PsbS proteinu na průběh listové senescence <i>Arabidopsis thaliana</i> vyvolané zatemněním listů. Teoretická část je věnována poznatkům o senescenci, fotosystému II (PSII) a degradaci jeho komponent během senescence, chlorofylové fluorescence a o vybraných lhcb knockout mutantech rostliny <i>A. thaliana</i> . Experimentální část je zaměřena na měření parametrů chlorofylové fluorescence odrážejících funkci PSII, stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů a měření parametrů odrážejících funkci fotosystému I. Bylo zjištěno, že v některých případech deficiencie lhcb urychluje pokles funkce fotosystému II vyvolaný zatemněním listů. Rychlejší pokles funkce PSII a degradace fotosyntetického aparátu byly pozorovány u genotypů NoM, <i>koLhcb6</i> a <i>koLhcb3koLhcb6</i> . Primární příčinou snížení funkce PSII je pravděpodobně změna organizace v rámci superkomplexu.
Klíčová slova:	<i>Arabidopsis thaliana</i> , fotosystém I, fotosystém II, chlorofylová fluorescence, listová senescence, světlo, světlosběrné komplexy, tma
Počet stran:	92
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: Bc. Markéta Vymětalíková

Title of thesis: Effect of deficiency of selected light-harvesting complexes and PsbS protein on leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*

Type of thesis: Diploma

Department: Laboratory of Growth Regulators, Department of Biophysics

Supervisor: doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.

The year of presentation: 2022

Abstract: The diploma thesis deals with the influence of the deficiency of selected light-harvesting complexes (lhcb) and PsbS protein on the course of leaf senescence of *Arabidopsis thaliana* induced by leaf darkening. The theoretical part is devoted to knowledge about senescence, photosystem II (PSII) and degradation of its components during senescence, chlorophyll fluorescence and selected lhcb knockout mutants of *A. thaliana*. The experimental part is focused on measuring the parameters of chlorophyll fluorescence reflecting PSII function, determining the content of photosynthetic pigments and measuring parameters reflecting function of photosystem I. It was found that in some cases deficiency in lhcb accelerates the decline in photosystem II function caused by leaf darkening. A faster decrease in PSII function and degradation of the photosynthetic apparatus were observed in genotypes NoM, *koLhcb6* and *koLhcb3koLhcb6*. The primary cause of reduced PSII function is probably a change in organization within the supercomplex.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, photosystem I, photosystem II, chlorophyll fluorescence, leaf senescence, light, light-harvesting complexes, dark

Number of pages: 92

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Marty Špundové, Ph.D., a za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

.....

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí práce doc. RNDr. Martině Špundové, Ph.D., za její čas, trpělivost, ochotu a odborné vedení při zpracovávání této diplomové práce. Ráda bych poděkovala také Mgr. Zuzaně Kučerové, Ph.D., a Pavle Ocvirkové za veškerou pomoc během měření a práce v laboratoři.

## OBSAH

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	2
2.1 Listová senescence .....	2
2.1.1 Světlo a senescence .....	4
2.2 Změny struktury a funkce fotosyntetického aparátu během listové senescence .....	7
2.2.1 Fotosyntéza.....	7
2.2.2 Fotosystém II (PSII).....	8
2.2.2.1 Superkomplex LHCI-PSII .....	10
2.2.2.1.1 Dvoudimenzionální krystaly .....	11
2.2.2.1.2 Megakomplexy .....	12
2.2.3 Fotosyntetický aparát a listová senescence .....	13
2.3 Chlorofylová fluorescence .....	17
2.3.1 Rychlá fluorescenční indukce .....	18
2.3.2 Pomalá fluorescenční indukce.....	19
2.3.3 Parametry chlorofylové fluorescence a jejich změny při senescenci .....	20
2.4 <i>Arabidopsis thaliana</i> a jeho „lhcb“ mutanti .....	21
2.4.1 <i>koPsbS</i> .....	22
2.4.2 <i>koLhcb3</i> .....	23
2.4.3 <i>koLhcb6</i> .....	24
2.4.4 <i>koLhcb3koLhcb6</i> .....	25
2.4.5 <i>koLhcb4.1koLhcb4.2koLhcb4.3</i> .....	26
2.4.6 <i>koLhcb5</i> .....	26
2.4.7 <i>koLhcb5koLhcb6</i> .....	27
2.4.8 <i>koLhcb4.1koLhcb4.2koLhcb5</i> („NoM“; no minor antennae mutant).....	27
2.4.9 <i>koLhcb3koLhcb6koLhcb4.1koLhcb4.2koLhcb4.3</i> („Penta“).....	27
2.5 Motivace diplomové práce .....	28
3 MATERIÁL A METODY .....	29
3.1 Rostlinný materiál .....	29
3.2 Chemikálie .....	30
3.3 Přístrojové vybavení.....	30
3.4 Software pro zpracování výsledků .....	30
3.5 Statistická analýza dat .....	30
3.6 Použité metody .....	30
3.6.1 Analytické stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů .....	30
3.6.2 Měření parametrů chlorofylové fluorescence .....	31

3.6.2.1 FluorCam.....	31
3.6.2.2 DualPAM .....	32
4 VÝSLEDKY .....	34
4.1 Experiment 1 .....	34
4.1.1 Oddělené listy.....	34
4.1.1.1 Obrazové záznamy parametrů $F_v/F_M$ , $F_0$ a $F_M$ .....	34
4.1.1.2 Obsah fotosyntetických pigmentů.....	38
4.1.1.3 Parametry $\Phi_P$ , NPQ a $1 - q_P$ .....	39
4.1.2 Individuálně zatemněné listy (IDL) .....	43
4.1.2.1 Obrazové záznamy parametrů $F_v/F_M$ , $F_0$ a $F_M$ .....	43
4.1.2.2 Obsah fotosyntetických pigmentů.....	46
4.1.2.3 Parametry $\Phi_P$ , NPQ a $1 - q_P$ .....	47
4.2 Experiment 2 .....	50
4.2.1 Obrazové záznamy parametrů $F_v/F_M$ , $F_0$ a $F_M$ .....	51
4.2.2 Obsah fotosyntetických pigmentů.....	56
4.2.3 Parametry $\Phi_P$ , NPQ a $1 - q_P$ .....	57
4.3 Experiment 3 .....	60
4.3.1 Obrazové záznamy parametrů $F_v/F_M$ , $F_0$ a $F_M$ .....	61
4.3.2 Obsah fotosyntetických pigmentů.....	65
4.3.3 Parametry $\Phi_P$ , NPQ a $1 - q_P$ .....	66
4.3.4 Parametry $Y(I)$ , $Y(ND)$ a $Y(NA)$ .....	69
4.4 Srovnání změn vybraných parametrů u genotypů WT, <i>koLhcb6</i> a <i>koLhcb3,6</i> .....	73
4.4.1 Parametr NPQ .....	73
4.4.2 Parametry $Y(I)$ , $Y(ND)$ a $Y(NA)$ .....	75
5 DISKUZE.....	76
6 ZÁVĚR.....	82
7 POUŽITÁ LITERATURA.....	86

## SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
CAB	protein vázající chlorofyl <i>a/b</i>
Car	karotenoidy
F <sub>M</sub>	maximální intenzita chlorofylové fluorescence vzorku adaptovaného na tmu
F <sub>V</sub> /F <sub>M</sub>	maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II
F <sub>0</sub>	minimální intenzita chlorofylové fluorescence vzorku adaptovaného na tmu
Chl <i>a/b</i>	chlorofyl <i>a/b</i>
IDL	individuálně zatemněné listy, (z angl. individually darkened leaves)
LHC	světlosběrný komplex, (z angl. light harvesting complex)
LHCII	světlosběrný komplex fotosystému II, (z angl. light harvesting complex II)
Lhcb protein	světlosběrný protein vázající chlorofyl <i>a/b</i> , (z angl. light-harvesting chlorophyll <i>a/b</i> -binding protein)
NADP	oxidovaná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
NADPH	redukováná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
NoM	<i>koLhcb4.1koLhcb4.2koLhcb5</i> , (z angl. no minor antennae mutant)
NPQ	nefotochemické zhášení, (z angl. non-photochemical quenching)
OEC	komplex vyvíjející kyslík, (z angl. oxygen evolving complex)
Penta	<i>koLhcb3koLhcb6koLhcb4.1koLhcb4.2koLhcb4.3</i>
PhyB	fytochrom B
PIFs	faktory interagující s fytochromem, (z angl. phytochrome interacting factors)
PQH <sub>2</sub>	plastochinol
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
Q <sub>A</sub>	primární chinonový akceptor elektronů
Q <sub>B</sub>	sekundární chinonový akceptor elektronů
qE	energetické zhášení, (z angl. energy-dependent quenching)
qI	fotoinhibiční zhášení, (z angl. photoinhibitory quenching)
qP	fotochemické zhášení, (z angl. photochemical quenching)
ROS	reaktivní formy kyslíku, (z angl. reactive oxygen species)
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa
SAGs	geny aktivované při senescenci, (z angl. senescence associated genes)
SDGs	geny utlumené při senescenci, (z angl. senescence down-regulated genes)



$\Phi_P$	aktuální kvantový výtěžek fotochemie PSII vzorků adaptovaných na světlo
$\Phi_{NPQ}$	kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení
$\Phi_{f,D}$	kvantový výtěžek konstitutivního neregulačního nefotochemického zhášení
Y(I)	efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSI
Y(ND)	kvantový výtěžek nefotochemické disipace energie daný limitací na donorové straně PSI
Y(NA)	kvantový výtěžek nefotochemické disipace energie daný limitací na akceptorové straně PSI
WT	standardní genotyp, (z angl. wild-type)
I - qP	excitační tlak na fotosystém II

## 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Senescence (stárnutí) rostlin je striktně řízený vývojový proces postupné degradace organel, buněk, tkání a orgánů vedoucí k smrti celého organismu. Je řízena geneticky. Její průběh však může ovlivňovat řada vnějších (např. světlo, teplota) a vnitřních (např. fytohormony) faktorů. Senescence a následná buněčná smrt může zasáhnout celý rostlinný organismus nebo pouze jeho určité části, např. květy či listy. Listová senescence je finální fází vývoje listu doprovázená přesunem živin (dusík, fosfor, síra a další minerály) ze senescentního listu do jiných částí rostliny (zpravidla do semen). Následkem rozpadu chloroplastů, chlorofylu a dalších důležitých makromolekul (pigment-proteinových komplexů včetně světlosběrných komplexů (LHC), enzymu Rubisco, membránových lipidů atd.) dochází k inhibici fotosyntézy. Změny ve fotosyntéze indukované senescencí lze stanovit na základě změn parametrů chlorofylové fluorescence jako je např. maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II ( $F_v/F_m$ ) nebo parametry zhášení fluorescence chlorofylu. Degradace chlorofylu se projevuje žloutnutím senescentních listů. Míra a pořadí degradace jednotlivých LHC závisí na podmínkách senescence i rostlinném druhu, přičemž mechanismus této degradace není objasněn. Je známo, že mutantní rostliny s deficiencí některých LHC mají ovlivněnou organizaci, funkci a stabilitu fotosyntetického aparátu, nicméně jejich senescence dosud nebyla popsána.

Cílem této diplomové práce je porovnat průběh senescence (konkrétně rychlost degradace chlorofylu a pokles fotosyntetické funkce) u vybraných mutantů *Arabidopsis thaliana* a posoudit vliv deficiencie jednotlivých LHC a PsbS proteinu.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Listová senescence

Senescence (stárnutí) rostlin je striktně řízený vývojový proces postupné degradace organel, buněk, tkání a orgánů vedoucí k smrti celého organismu (Noodén 1988). U rostlin je možné rozlišit dva typy senescence, a to mitotickou (replikativní, proliferativní) a postmitotickou. Jako mitotická senescence se označuje proces, kdy buňka trvale ztratí schopnost mitoticky se dělit. Příkladem mitotické senescence může být zastavení buněčného dělení v buňkách apikálního meristému nebo v plodech nacházejících se v časném vývojovém stádiu (Gan 2007, Hensel a kol. 1994, Tanksley 2004). Postmitotická senescence je proces, kdy již mitoticky neaktivní buňky podléhají degenerativním jevům vedoucím až k buněčné smrti (Gan 2007).

Senescence a následná buněčná smrt může zasáhnout celý organismus nebo pouze jeho určité části, u rostlin např. květy či listy (Noodén a kol. 1997). Listová senescence je finální fází vývoje listu.

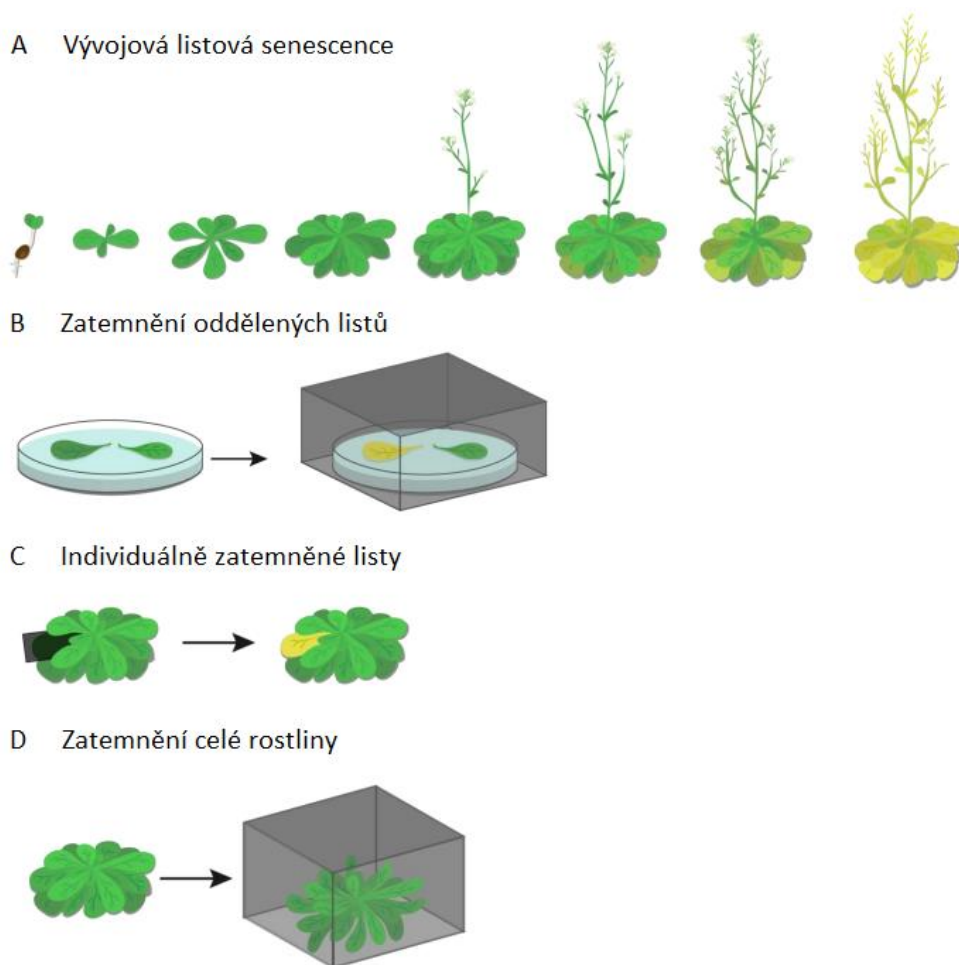
Postmitotická listová senescence má 3 fáze: iniciační, reorganizační (degradační) a terminační (Noodén a kol. 1997). Během iniciační fáze dochází ke změnám v genové expresi. Listová senescence je regulována na několika úrovních. Regulace na úrovni chromatinu zahrnuje modifikace histonů a chromatinové přestavby. Při regulaci transkripce dochází ke změnám genové exprese, a to zejména ke zvýšené expresi SAGs (senescence associated genes) kódujících produkty podílející se na degradaci buněčných komponent, transportu živin nebo detoxifikaci oxidačních metabolitů, a k snížené expresi SDGs (senescence down-regulated genes), jejichž produkty se účastní fotosyntézy (např. gen pro protein vázající chlorofyl *a/b* (CAB) nebo gen malé podjednotky enzymu Rubisco (SSU)). Příklady senescenčně specifických SAGs jsou SAG12 a SAG13 u *Arabidopsis thaliana* nebo LSC54 u *Brassica napus*. Posttranskripční regulaci zprostředkovávají miRNAs a tasiRNAs (trans-acting small interference RNA). Translační a posttranslační regulace spočívá v úpravách genových produktů fosforylací a ubikvitinací (Gan a Amasino 1997, Woo a kol. 2013, Kim a kol. 2018, Špundová 2019).

Během reorganizační fáze dochází k rozpadu chloroplastů doprovázenému katabolismem chlorofylu, a tak inhibicí fotosyntézy, a k degradaci důležitých makromolekul jako jsou proteiny, membránové lipidy nebo RNA (Gan a Amasino 1997). Nahromaděné jednoduché živiny (např. dusík, fosfor, síra a další minerály) jsou přesouvány ze senescentního listu do jiných částí rostliny (Špundová 2019). U jednoletých rostlin jsou živiny transportovány

do semen, u trvalých rostlin pak do stonků či kořenů, kde mohou být využity jako zdroj pro vývoj nových listů a květů (Woo a kol. 2019). Rozpad chlorofylu a remobilizace živin se projevuje žloutnutím senescentních listů. Během senescence jsou rozkládány všechny fotosyntetické pigmenty – chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, karoteny i xantofyly. Obecně jsou však rychleji degradovány chlorofyly než karotenoidy, výsledkem čehož je právě žluté zabarvení senescentních listů (Biswal 1995). V průběhu degradační fáze zpravidla dochází ve zvětšené míře k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), které zodpovídají za oxidační poškození DNA, proteinů a lipidů membrán. Lipidová peroxidace, jakožto přímý důsledek zvýšené tvorby ROS, bývá uváděna jako jeden z typických příznaků senescence. Malondialdehyd (MDA), produkt lipidové peroxidace, pak patří mezi základní markery při studiu senescence (Mik a kol. 2011).

Terminační fáze zahrnuje programovanou buněčnou smrt, která je kontrolována stářím buněk a ovlivňována vnitřními a vnějšími (environmentálními) faktory. Jako první začínají odumírat buňky mezofylu, následně i další typy buněk, nejpозději pak odumírají buňky v okolí cévních svazků, které jsou důležité pro přesun živin ze senescentního listu. Na listech se zpočátku objevují drobná ložiska tvořená odumřelými buňkami, tyto oblasti se postupně zvětšují. Hynutí listu obvykle postupuje od špičky či okraje směrem ke středu (Gan a Amasino 1997, Lim a kol. 2007).

Senescence je ovlivňována řadou vnitřních (autonomních) a vnějších (environmentálních) faktorů. Mezi environmentální faktory ovlivňující senescenci patří vysoká teplota, sucho, nedostatek vody a živin, poranění, nadměrné osvětlení, zastínění či napadení patogeny. Naopak vnitřní faktory zahrnují stáří rostliny (či orgánu), rostlinné hormony a ROS. Ve vztahu k těmto faktorům lze senescenci rozdělit na přirozenou a indukovanou. Přirozená (vývojová) senescence nastává bez působení environmentálních stresových faktorů, je řízena vývojově. Indukovanou senescenci naopak vyvolávají stresové faktory. V laboratorních podmínkách bývá v oddělených rostlinných orgánech, nejčastěji listech, indukována působením nějakého stresu (zatemnění, aplikace růstových regulátorů) tzv. umělá senescence (Gan a Amasino 1997). Při studiu listové senescence se využívá několika přístupů jako např. oddělení vybraných listů a jejich inkubace ve tmě, zatemnění individuálních listů na jinak osvětlované rostlině nebo zatemnění celé rostliny (Weaver a Amasino 2001) (Obr. 1).



Obr.1: Příklady experimentálních přístupů při studiu listové senescence u *Arabidopsis thaliana*. Na obrázku (A) je znázorněna vývojová listová senescence (DLS, developmental leaf senescence), obrázek (B) ukazuje oddělené listy umístěné ve vodě v Petriho misce inkubované ve tmě, na obrázku (C) je na rostlině jeden z listů zatemněn alobalem (IDL, individually darkened leaves) a na obrázku (D) je zobrazeno zatemnění celé rostliny (DP, darkened plant). Převzato a upraveno z Chrobok (2018).

### 2.1.1 Světlo a senescence

Světlo hraje zásadní roli během růstu a vývoje rostlin. Je nezbytné pro fotosyntézu, pro komunikaci s vnějším prostředím a jako signál pro normální vývoj rostliny. Reakce rostliny s prostředím zprostředkovávají specifické pigmenty jako je fytochromový (registruje červenou a dalece červenou složku světla), kryptochromový (registruje modrou složku světla) nebo fototropinový (registruje modrou složku světla) světelný receptor a jejich signální transdukční dráhy (Gan 2007). *Arabidopsis thaliana* reaguje na červenou a dalece červenou složku světla prostřednictvím pěti fytochromů (phyA-E) a na modrou složku světla pomocí dvou kryptochromů (CRY1 a CRY2) a fototropinů. Fototropiny (phot1 a phot2) regulující fototropismus byly původně identifikovány u mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana nph1* (non-phototropic hypocotyl 1) (Huala a kol. 1997, Briggs a Olney 2001). Fytochromy

(konkrétně phyB) mají schopnost inaktivovat tzv. PIFs (phytochrome interacting factors), což je rodina transkripčních faktorů „helix-loop-helix“ (bHLH), které během tmy inhibují reakce závislé na světle a podílí se (obzvláště PIF3, PIF4 a PIF5) na regulaci jak senescence indukované zatemněním, tak přirozené senescence. PIFs jsou aktivovány během tmy (phyB je inaktivován) a podporují senescenci indukovanou zatemněním. Na světle jsou PIFs vlivem interakce s aktivními phyB degradovány, čímž je indukce senescence potlačena (Sakuraba a kol. 2014, Song a kol. 2014).

Rostliny dokážou zaznamenávat intenzitu, kvalitu, směr a periodicitu dopadajícího světla a využívat tyto informace k optimalizaci růstu a vývoje v souladu s měnícím se prostředím (Gan 2007). Světlo má schopnost zpomalit i urychlit senescenci. Senescenci dokáže zpomalit např. světlo střední intenzity (přibližně do  $100 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Např. Kar a kol. (1993) pozorovali u primárních listů sazenic žita (*Secale cereale* L.) vystavených mírnému světle o intenzitě  $90 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ve srovnání se zatemněnými listy zpomalení úbytku enzymu katalázy (jeden z enzymů chránících buňku před poškozením volnými radikály) a chlorofylu. Špundová a kol. (2003) pozorovali u listových segmentů pšenice (*Triticum aestivum* L.) inkubovaných na kontinuálním světle intenzity  $90 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  podobnou rychlost poklesu obsahu chlorofylu jako u zatemněných listů. Nesoulad mezi získanými výsledky a výsledky jiných autorů (např. Kar a kol. 1993) mohl být dán různými světelnými podmínkami během pěstování rostlin a během experimentu. Rostliny byly v rámci tohoto experimentu pěstovány v periodickém světelném režimu (8h tma/16 h světlo) a následně byly oddělené listové segmenty vystaveny na několik dnů kontinuálnímu světle stálé intenzity. Změna světelných podmínek mohla představovat nárůst absorbované světelné energie tkáněmi listových segmentů, přičemž v této situaci se zvyšuje riziko fotooxidačního poškození včetně destrukce pigmentových molekul. V případě vyšších dávek světla totiž v oddělených listech nastává převaha tvorby asimilátů nad jejich spotřebou a dochází ke zpětnovazební inhibici fotosyntézy, která může vést k nadměrné excitaci fotosyntetického aparátu, akumulaci ROS a oxidačnímu poškození, čímž se senescence urychluje (Špundová 2019). V některých případech tedy ošetření světlem nedokáže zpomalit listovou senescenci.

Naopak vystavení listů světle vysoké intenzity nebo jejich zatemnění po delší časový úsek jsou jedním z hlavních spouštěčů listové senescence. Světlo o vysoké intenzitě způsobuje přeexcitování fotosyntetického aparátu, což vede k produkci ROS a následnému fotooxidativnímu poškození fotosyntetického aparátu a peroxidaci lipidů (Vlčková a kol. 2006). Vystavení rostliny kontinuálnímu a silnému světle vyvolává úbytek chlorofylu, snížení účinnosti fotosyntézy (snížení parametru  $F_v/F_m$ ) a akumulaci škrobových zrn a antokyanů

(Procházková a Wilhelmová 2004, Vlčková a kol. 2006, Elgimabi 2017). Nahromadění škrobových zrn je pravděpodobně způsobeno oddělením listů, kdy je zabráněno přesunu asimilátů do ostatních částí rostliny, a nepřetržitým vystavením světelnému záření bez zatemnění (Špundová a kol. 2003). Antokyany mají zřejmě úlohu optického filtru a zabraňují tak fotooxidačnímu poškození buněk listů (Elgimabi 2017).

Listová senescence zatemněných oddělených listů je obecně charakterizována degradací fotosyntetických pigmentů, pigment-proteinových komplexů a snížením fotosyntetické aktivity (Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006, Janečková a kol. 2018). Vlčková a kol. (2006) navíc pozorovali u listů pšenice (*Triticum aestivum* L.) inkubovaných 4 dny ve tmě změnu tvaru chloroplastů z elipsoidních na sférické, shlukování plastidů, dezorganizaci tylakoidních membrán a akumulaci plastoglobulí, což jsou typické strukturní změny doprovázející listovou senescenci.

Působení světla na senescenci je ovlivňováno také celistvostí rostliny. Je známo, že u individuálně zatemněných listů a oddělených listů inkubovaných ve tmě dochází k indukci senescence rychleji než u celistvých rostlin umístěných do tmy. U celistvých rostlin umístěných do tmy nedochází k výraznému úbytku proteinů a chlorofylu, je zachována fotosyntetická kapacita a nenastává exprese SAGs. U individuálně zatemněných a oddělených listů klesá počet a velikost chloroplastů, snižuje se obsah chlorofylu, fotosyntetická funkce je zhoršena a dochází k omezení exprese genů kódujících fotosyntetické proteiny (Weaver a Amasino 2001, Keech a kol. 2007). Dle Keech a kol. (2007) dochází v listech celistvých rostlin umístěných do tmy k přepnutí do „pohotovostního režimu“, aby byla funkce fotosyntetického aparátu zachována co nejdéle, zatímco u individuálně zatemněných listů je senescence urychlena a energie z mitochondrií je aktivně využívána k degradaci buněčných složek, kdy jsou získané jednoduché živiny přemísťovány ze zatemněných listů do ostatních částí rostliny. Při zakrytí určitých listů na rostlině dochází k senescenci jen u těchto individuálně zatemněných listů, nikoli u celé rostliny.

## 2.2 Změny struktury a funkce fotosyntetického aparátu během listové senescence

### 2.2.1 Fotosyntéza

Převážná většina rostlin patří mezi fotoautotrofní organismy, které využívají světelnou energii k přeměně oxidu uhličitého a vody na sacharidy za současného uvolnění molekulárního kyslíku v procesu zvaném oxýgenní fotosyntéza.

Hlavními orgány rostlin zajišťujícími fotosyntézu jsou listy. Listy byly vývojově uzpůsobeny k maximální absorpci slunečního záření. Oxid uhličitý přijímají skrze průduchy (dvě specializované svěrací buňky, mezi nimiž je štěrbina). Samotná fotosyntéza pak probíhá uvnitř listů v buňkách listového mezofylu ve funkčně specializovaných organelách – chloroplastech (Procházka a kol. 1998).

Chloroplasty obaluje vnější a vnitřní membrána, pod kterou je tzv. stroma. Ve stromatu se nachází tylakoidy tvořící vnitřní membránový systém složený ze zploštělých měchýřků, které bývají seskupeny v sloupcovité útvary zvané grana. Granální tylakoidy mohou být stěsnané, kdy na sebe membrány navzájem naléhají, nebo nestěsnané, které jsou svými vnějšími stěnami ve styku se stromatem. Spojovací lamely mezi grany jsou označovány jako stromální tylakoidy (Procházka a kol. 1998).

V membránách tylakoidů jsou zakotveny komplexy, ve kterých probíhá primární (jinak fotochemická či světelná) fáze fotosyntézy. Jedná se o fotosystém II (PSII), cytochrom *b<sub>6</sub>f*, fotosystém I (PSI) a ATP-syntasu, přičemž struktury PSII a LHCII se nachází v membránách stěsnaných granálních tylakoidů, PSI s ATP-syntasou v membránách stromatálních a nestěsnaných granálních tylakoidů a komplex cytochrom *b<sub>6</sub>f* v membránách obou typů tylakoidů (Dekker a Boekema 2005). V primární fázi fotosyntézy dochází k přenosu elektronů z vody na NADP za vzniku redukované formy NADPH. Zároveň jsou do lumenu tylakoidů přesouvány vodíkové kationty, které jsou využívány ATP-syntasou při fosforylaci ADP na ATP. V této fázi dochází také k uvolnění molekulárního kyslíku. NADPH a ATP jsou následně využity během sekundární (syntetické, temnotní) fáze fotosyntézy odehrávající se ve stromatu k syntéze sacharidů a dalších látek (Johnson 2016).



## 2.2.2 Fotosystém II (PSII)

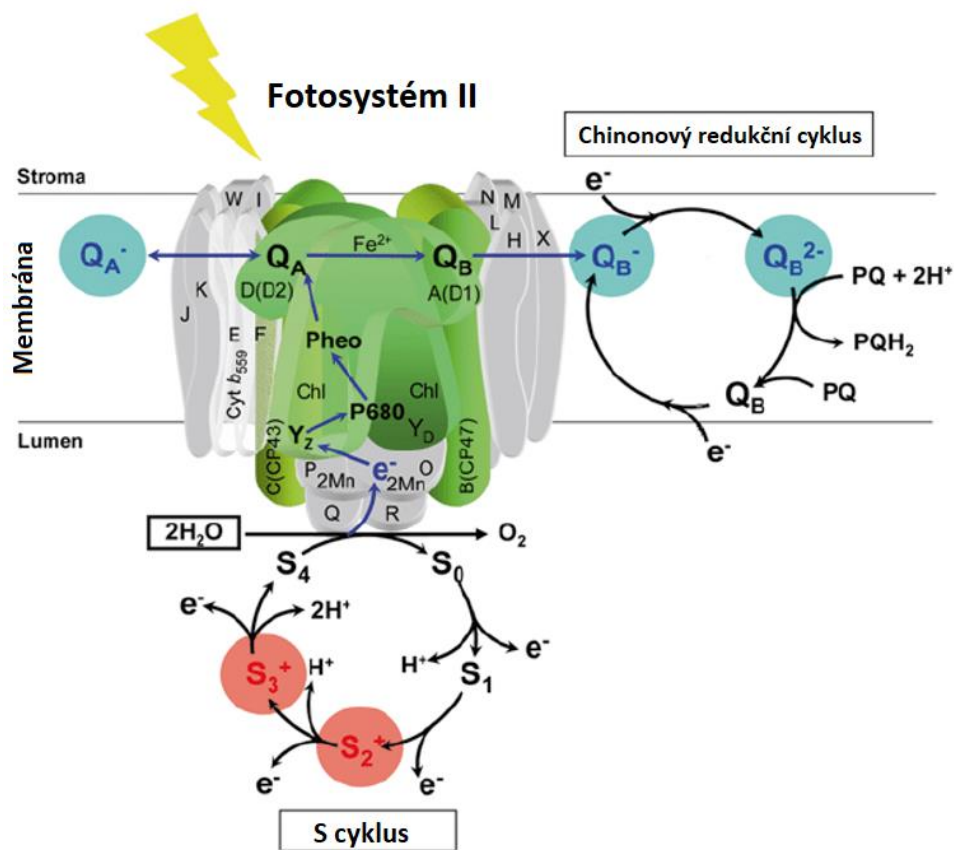
Fotosystém II je složitý proteinový komplex zabudovaný v membráně tylakoidů obsahující jádro (core) a světlosběrný systém (LHCII).

Jaderný komplex fotosystému II (Obr. 2) se skládá ze 4 velkých vnitřních podjednotek (PsbA (D1), PsbB (CP47), PsbC (CP43) a PsbD (D2)), 12 malých podjednotek (PsbE, PsbF, PsbH, PsbI, PsbJ, PsbK, PsbL, PsbM, PsbTc, PsbW, PsbX a PsbZ) a 4 vnějších podjednotek vystavených do lumenu tylakoidů (PsbO, PsbP, PsbQ a PsbTn) (Wei a kol. 2016).

Centrální část jaderného komplexu fotosystému II představuje heterodimer, který je tvořen proteiny D1 (PsbA) a D2 (PsbD). Každý z těchto proteinů se skládá z 5 transmembránových helixů a váže 6 molekul chlorofylu *a* a 2 molekuly feofytinu (barvivo podobné chlorofylu bez atomu hořčíku podílející se na přenosu elektronu z chl *a* na chinony). Obsahují reakční centrum P680 a vážou komponenty (kofaktory) důležité pro separaci náboje a pro elektronový transportní řetězec. Připojují se k nim vnitřní světlosběrné antény CP43 (PsbC) a CP47 (PsbB) složené z 6 transmembránových helixů a nesoucí 14 (respektive 16) molekul chlorofylu *a* a 5 molekul  $\beta$ -karotenu (Caffari a kol. 2009, Nelson a Ben-Shem 2004). Funkcí CP43 a CP47 je přenos excitační energie z vnějších světlosběrných komplexů do reakčního centra (Amerongen a Croce 2013).

Kolem centra jaderného komplexu se shromažďují malé podjednotky, které nevážou žádné pigmenty a slouží převážně ke stabilizaci a regulaci aktivity PSII (Huang a kol. 2013, Wei a kol. 2016).

U vyšších rostlin na lumenální straně tylakoidní membrány formují podjednotky PsbO, PsbP a PsbQ tzv. komplex vyvíjející kyslík (OEC), který se podílí na stabilizaci Mn klastru potřebného pro oxidaci vody za účelem získání elektronů (Huang a kol. 2013). Funkce PsbTn prozatím nebyla objasněna (Shi a Schroder 2014).



Obr. 2: Schéma jádra fotosystému II (PSII) znázorňující jeho polypeptidové složení a transport elektronů přes PSII. Pohlcením světla se reakční centrum P680 excituje na  $P680^*$ . Excitovaný elektron přechází přes feofytin (Pheo) na menachinon  $Q_A$ . K redukci ubichinonu  $Q_B$  jsou potřeba 2 elektrony, tedy 2 excitační cykly, spolu se 2 protony pocházejícími ze stromatu chloroplastu. Na přenosu elektronů mezi  $Q_A$  a  $Q_B$  se podílí i atom železa. Plastochinol  $PQH_2$  vzniká přenosem 2 elektronů z  $Q_B$  a 2 protonů ze stromatu na plastochinon PQ.  $PQH_2$  se následně pohybuje tylakoidní membránou k cytochromu  $b_6/f$ , kde předává své elektrony, které jsou dále převáděny až do fotosystému I. Oxidovaný  $P680^+$  získá elektron nazpět z komplexu vyvíjejícího kyslík (OEC) rozkladem vody. Rozklad vody se dá vysvětlit na tzv. S-modelu. V OEC se nachází klastr 4 vázaných atomů Mn a vývoj kyslíku oxidací vody je zde realizován postupným přechodem ze stavu  $S_0$  přes  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  do  $S_4$ . Při rozštěpení molekuly vody redukuje uvolněné elektrony nejprve Mn klastr, poté tyrozin v pozici 161 ( $Y_Z$ ) a nakonec  $P680^+$  (Procházková a kol. 1998). Převzato a upraveno z Sane a kol. (2012).

Jádro je obklopeno periferním (vnějším) světlosběrným systémem (LHCII). Hlavními funkcemi periferního světlosběrného systému je absorpce světla, přenos excitační energie do reakčního centra a regulace fotosyntézy prostřednictvím fotoprotektivních mechanismů (přeměna přebytečné energie v teplo – tzv. nefotochemické zhášení). Na Lhcb proteiny (light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins) se vážou pigmenty chlorofyl *a*, chlorofyl *b*,  $\beta$ -karoten a xantofyly, jež jsou zodpovědné za absorpci světla (Amerongen a Croce 2013). Periferní světlosběrný systém se dále dělí na minoritní a majoritní. Majoritní světlosběrný systém se skládá z heterotrimerů Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3. Minoritní světlosběrný systém tvoří monomery CP24 (Lhcb6), CP26 (Lhcb5) a CP29 (Lhcb4) (Caffari a kol. 2009). Nedávno byly objeveny podjednotky Lhcb7 a Lhcb8. Protein Lhcb7 se strukturně podobá podjednotce Lhcb5

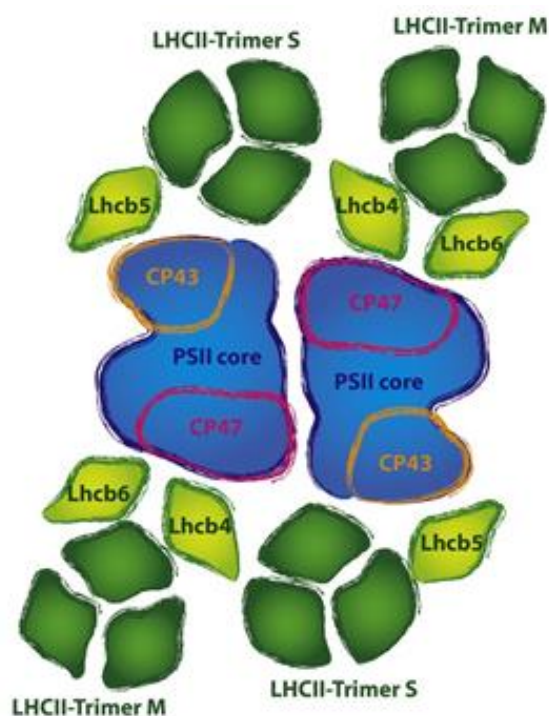
a jako Lhcb8 se označuje podjednotka Lhcb4.3, což je izoforma CP29 (Lhcb4) (Klimmek a kol. 2006).

Speciální podskupinou LHC proteinů jsou proteiny podobné LHC (LHC-like proteins), kam se řadí i PsbS protein. PsbS je tvořen 4 helixy, váže fotosyntetické pigmenty, ale na rozdíl od jiných proteinů vázajících chlorofyl *a/b* (CAB) se neúčastní procesu absorpce světla. Vazba zeaxantinu (typ xantofylu) na PsbS protein však hraje klíčovou roli v procesu nefotochemického zhášení chlorofylové fluorescence (NPQ) sloužícího k disipaci přebytečné světelné energie absorbované světlosběrným systémem. Jednou z vlastností PsbS proteinu je volný pohyb v tylakoidní membráně. Dokáže řídit makro-organizaci granálních částí tylakoidních membrán v chloroplastech vyšších rostlin, kdy se účastní např. reorganizace PSII při vysokém osvětlení. Ukázalo se, že asociuje jak s LHCII trimery, tak s jaderným komplexem PSII. Regulace těchto interakcí pak pravděpodobně probíhá skrze konformační změny indukované změnou pH (Pagliano a Saracco 2013).

### 2.2.2.1 Superkomplex LHCII-PSII

Strukturní analýza fotosystému II prokázala, že světlosběrný systém a dimer reakčního centra utváří superkomplex LHCII-PSII. Tzv. minimální superkomplex LHCII-PSII ( $C_2S_2$ ) se skládá z dimerního RC ( $C_2$ ), které se prostřednictvím monomerů CP26 (Lhcb5) a CP29 (Lhcb4) připojuje ke dvěma silně („strongly“) vázaným LHCII trimerům ( $S_2$ ). Trimery S jsou tvořeny majoritními anténami Lhcb1 a/nebo Lhcb2. Původně u špenátu (*Spinacia oleracea*) a *Arabidopsis thaliana* byl objeven superkomplex  $C_2S_2M_2$ , kde jsou dva středně silně („moderate“) vázané trimery LHCII ( $M_2$ ) propojeny přes monomery CP24 (Lhcb6) a CP29 (Lhcb4) se superkomplexem  $C_2S_2$ . Trimery M obsahují majoritní antény Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3. Největší superkomplex  $C_2S_2M_2L_{1-2}$  byl nalezen u špenátu (*Spinacia oleracea*), kde superkomplex  $C_2S_2M_2$  obsahuje navíc jeden nebo dva volně („loosely“) vázané trimery LHCII ( $L_{1-2}$ ) (Obr. 3) (Huang a kol. 2013, Boekema a Semchonok 2019).

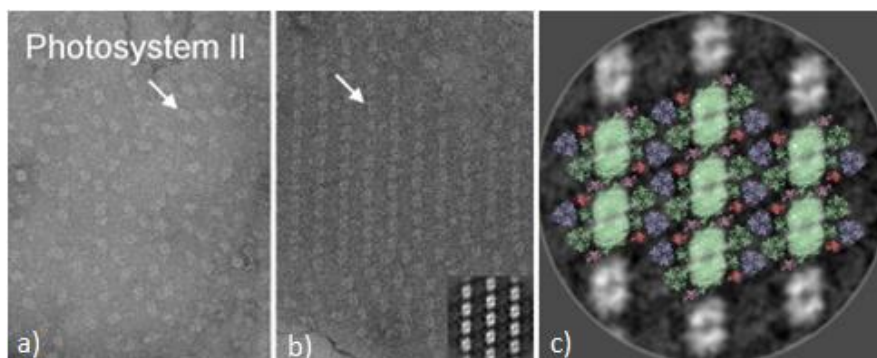
Superkomplexy LHCII-PSII jsou v granech většinou uspořádány náhodně, ale za určitých podmínek spolu mohou interagovat za vzniku dvoudimenzionálních krystalů nebo megakomplexů.



Obr. 3: Schéma uspořádání  $C_2S_2M_2$  superkomplexu, který se typicky vyskytuje u *Arabidopsis thaliana* a dalších krytosemenných rostlin. Lhcb1, Lhcb2 a Lhcb3 se náhodně kombinují za vzniku LHCII-trimeru: LHCII-trimer S – silně vázaný a LHCII-trimer M – středně silně vázaný. S-trimer asociuje s monomerem Lhcb5, který se váže k podjednotce jádra (PSII core) CP43. M-trimer je připojen k monomerům Lhcb4 a Lhcb6. Lhcb4 se váže k podjednotce jádra CP47. Převzato a upraveno z Ballottari a kol. (2012).

### 2.2.2.1.1 Dvoudimenzionální krystaly

Krystalové struktury mohou vytvářet 3 typy superkomplexů ( $C_2S_2$ ,  $C_2S_2M$ ,  $C_2S_2M_2$ ) a vznikají za předpokladu separace od ostatních membránových proteinů (Kouřil a kol. 2016) (Obr. 4). Na jejich tvorbě se podílejí různé faktory jako je snížená teplota, nízká intenzita osvětlení, nedostatek PsbS proteinu a některých Lhcb proteinů nebo vysoká koncentrace cukrů a specifické pH pufru. Dle Kirchhoffa a kol. (2013) je organizace do semikrystalických domén strategií k překonání problému přeplněné tylakoidní membrány při nízkém osvětlení. Při nízkém osvětlení rostliny dochází ke zvýšení počtu světlosběrných komplexů (LHCII) a zároveň ke snížení obsahu PSII a komplexu cytochrom *b<sub>6</sub>f*, naopak za vyššího osvětlení se snižuje počet LHCII a zvyšuje počet PSII a komplexu cytochrom *b<sub>6</sub>f*. U rostlin vystavených osvětlení vyšší intenzity byl pozorován úbytek krystalických domén (Kirchhoff a kol. 2007, Kirchhoff a kol. 2013). Zvýšená tvorba krystalických domén byla pozorována při nedostatku či v nepřítomnosti proteinů PsbS, Lhcb5 a Lhcb6. Při absenci Lhcb4 proteinu vykazoval PSII superkomplex jiné uspořádání. Při nedostatku Lhcb1 a Lhcb2 bylo uspořádání PSII komplexů podobné jako u kontrolního vzorku (Goral a kol. 2012, Ilíková a kol. 2021).



Obr. 4: Příklady elektronových mikrosnímků negativně obarvených granálních membrán izolovaných z *Arabidopsis thaliana* znázorňující náhodnou (a) a uspořádanou (b) organizaci PSII komplexů. Bílé šipky ukazují na jaderné komplexy PSII. Obrázek (c) získaný obrazovou analýzou zobrazuje podoblast uspořádaných domén superkomplexů PSII vybranou z elektronového snímku. Převzato z Kouřil a kol. (2013).

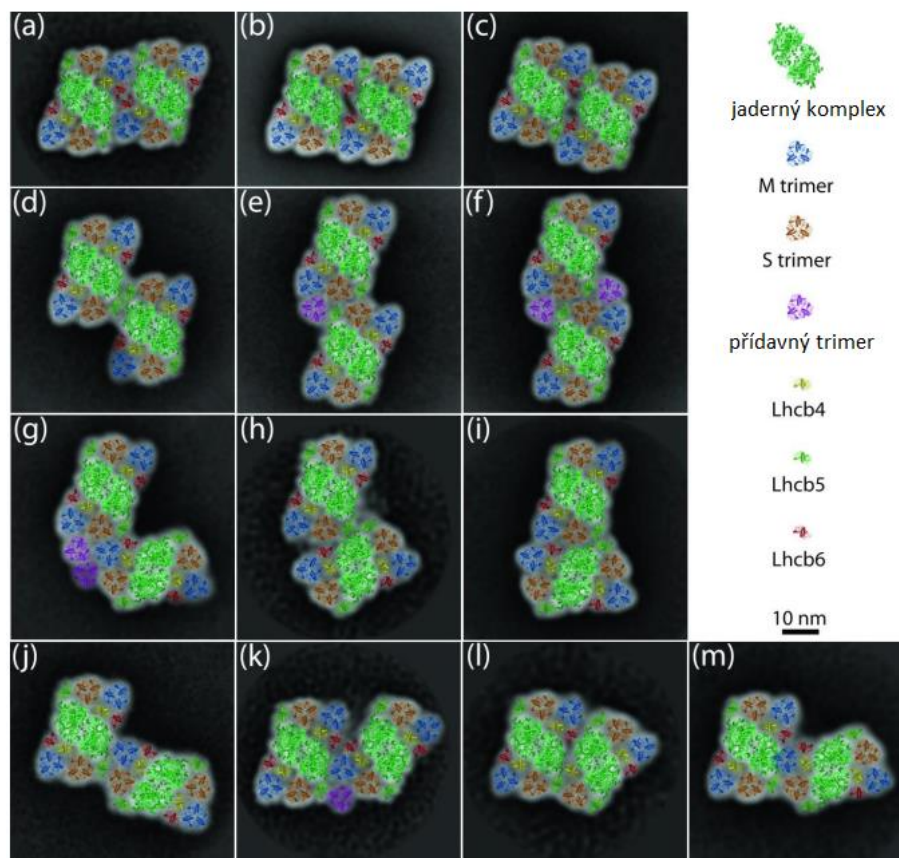
### 2.2.2.1.2 Megakomplexy

LHCII-PSII superkomplexy se mohou spojovat a vytvářet megakomplexy jako například  $C_4S_4$  složený ze dvou  $C_2S_2$  superkomplexů nebo  $C_4S_4M_{2-4}$  složený ze dvou  $C_2S_2M_{(2)}$  superkomplexů (Huang a kol. 2013). Nosek (2017) pozoroval u *Arabidopsis thaliana* řadu megakomplexů složených ze dvou PSII superkomplexů paralelně propojených přes jaderné komplexy, M trimery, Lhcb5 a Lhcb6 proteiny. Jako prvním se mu podařilo detekovat také megakomplexy s neparalelně orientovanými superkomplexy (Obr. 5). Pro formaci obou typů megakomplexů se zdá být nejpodstatnější Lhcb5 protein. Dynamická formace/dezintegrace megakomplexů zřejmě řídí využití absorbované energie PSII superkomplexy.

Huang a kol. (2013) zjistili, že protein THF1 (thylakoid formation 1) objevený u *A. thaliana* interaguje s LHCII a hraje podstatnou roli při degradaci LHCII-PSII megakomplexů během senescence indukované tmou. U mutantů *A. thaliana* s deficiencí THF1 (*thf1*) byla i během indukované senescence detekována přítomnost LHCII-PSII megakomplexů, přičemž současně byl opožděn rozpad chlorofylu. Z toho se usuzuje, že degradace chlorofylu vyžaduje předchozí rozklad PSII-LHCII komplexů.

Schwarz a kol. (2018) prokázali existenci komplexů PSI-LHCII ve stromálních lamelách. Bylo objeveno, že se tyto komplexy tvoří v reakci na vysokou intenzitu světla a během stárnutí. Autoři zjistili, že rychlá a dynamická reorganizace komplexů PSI-LHCII v reakci na měnící se intenzitu světla závisí na fosforylaci PSII a zdá se, že zahrnuje tvorbu komplexů PSI-PSII-LHCII.

Mechanismus degradace megakomplexů a superkomplexů je doposud neznámý.



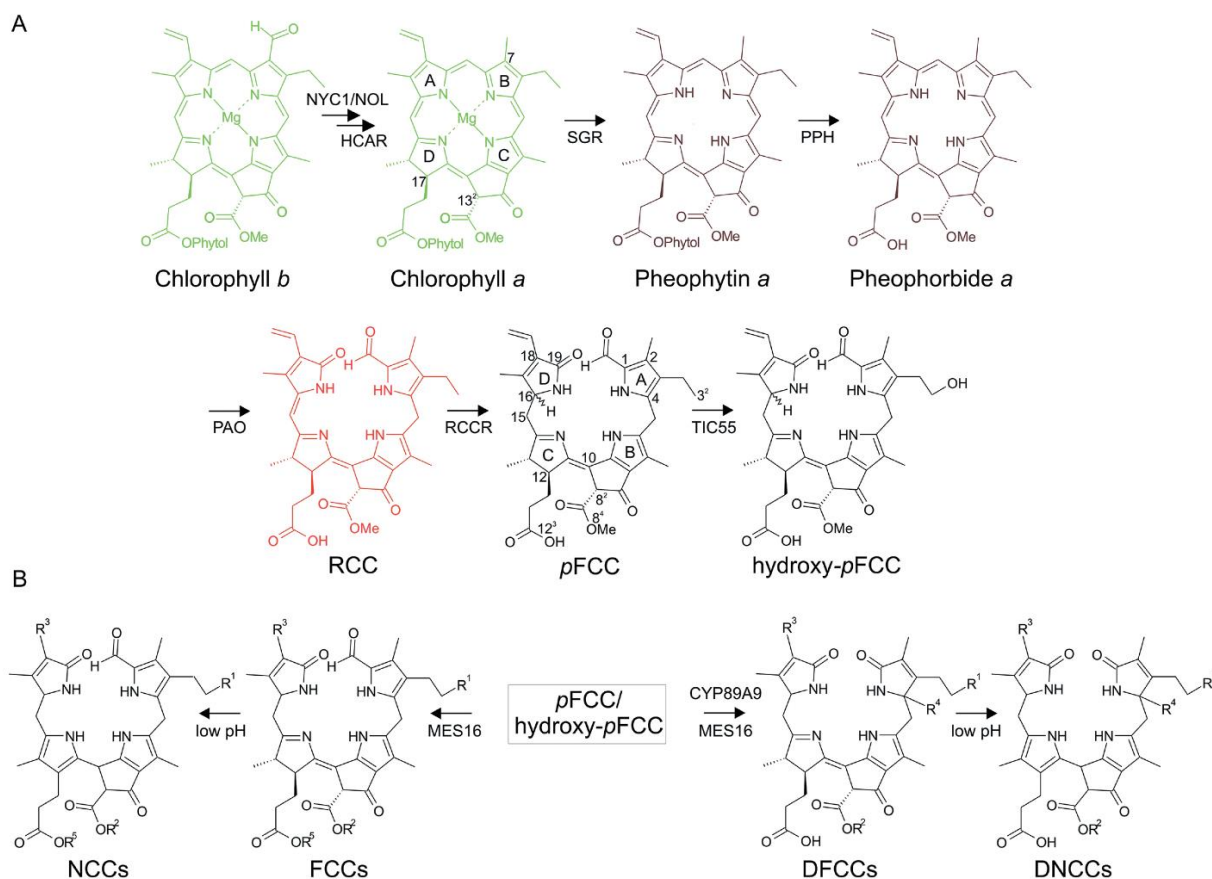
Obr. 5: Strukturální modely PSII megakomplexů u *Arabidopsis thaliana*. Na obrázcích (a–f) jsou znázorněny megakomplexy se dvěma paralelně orientovanými PSII superkomplexy, zatímco na obrázcích (g–m) jsou megakomplexy se dvěma neparalelně orientovanými PSII superkomplexy. Převzato z Nosek (2017).

### 2.2.3 Fotosyntetický aparát a listová senescence

Listová senescence je degenerativní proces, během kterého se rozpadají buněčné organely a makromolekuly (proteiny, nukleové kyseliny, lipidy). Vzniklé katabolity jsou pak z listů remobilizovány do jiných tkání, nejčastěji reprodukčních orgánů a nových listů (Guo a kol. 2021). Prvními degradovanými organelami během senescence jsou chloroplasty obsahující až 70 % veškerých listových proteinů. Jejich degradace je započata změnou struktury a obsahu gran a formací tzv. plastoglobulí (lipoproteinové částice). V rámci proteinů tylakoidní membrány dochází nejprve k rozpadu komplexů cytochrom *b<sub>6</sub>f*, poté i obou fotosystémů (PSI, PSII), světlosběrných komplexů, a nakonec ATP-syntasy (Noodén a kol. 1997). Nejdéle neporušené zůstávají struktury jádra a mitochondrií.

Degradaci chloroplastů doprovází degradace chlorofylu a dalších proteinů nacházejících se v chloroplastech jako např. ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa (enzym Rubisco) nebo protein vázající chlorofyl *a/b* (CAB) (Lim a kol. 2007).

Degradace chlorofylu začíná přeměnou chlorofylu *b* na chlorofyl *a* během dvoustupňové reakce katalyzované chlorofyl *b* reduktasami NYC1 (non-yellow coloring 1) a NOL (NYC1-LIKE) za vzniku 7-hydroxymethyl chlorofylu *a*, který je v dalším kroku přeměněn pomocí enzymu hydroxymethyl Chl *a* reduktasy (HCAR) na chlorofyl *a*. Enzym NYE (non-yellowing) (jinak stay-green, SGR) s Mg-dechelatasovou aktivitou degraduje chlorofyl *a* na feofytin *a*. V dalším kroku (tzv. defytylaci) vzniká z feofytinu *a* za katalýzy feofytinasy (PPH) feoforbid *a* (Pheide *a*). Feoforbid *a* se s pomocí enzymu Pheide *a* oxygenasy (PAO) mění na tzv. červený chlorofylový katabolit (RCC; red chlorophyll catabolite), který se vlivem RCC-reduktasy (RCCR) převádí na primární fluorescenční chlorofylový katabolit (pFCC; primary fluorescent chlorophyll catabolite). Fluorescenční fylobiliny (pFCC a hydroxyl-pFCC) jsou transportovány do cytosolu, kde podléhají různým úpravám – u *Arabidopsis thaliana* např. probíhá demethylace pFCC katalyzovaná methylesterasou 16 (MES16), nebo deformylace pFCC na pFDCC pomocí CYP89A9. Modifikované FCCs následně vstupují do vakuoly, kde jsou v důsledku kyselého pH přeměny na nefluorescenční chlorofylové katabolity (NCCs), popř. nefluorescenční chlorofylové katabolity dioxobilanového typu (DNCCs) (Obr. 6). Přenos katabolitů ze senescentních chloroplastů (gerontoplastů) do vakuoly zprostředkovává transportní systém závislý na ATP (Hörtensteiner 2006, Ríos a kol. 2014, Kuai a kol. 2018).



Obr. 6: Schéma PAO/fylobilinové dráhy degradace chlorofylu v listech vyšších rostlin. (A) První část dráhy, kde dochází k postupné přeměně chlorofylu na hydroxy-pFCC. Uvedené reakce probíhají uvnitř chloroplastu. (B) Druhá část dráhy, kde dochází k reakcím modifikujícím pFCC/hydroxy-pFCC. Tyto reakce probíhají mimo chloroplasty a vedou ke vzniku rozmanitých fylobilinů. Enzymy MES16 a CYP89A9 jsou specifické pro *Arabidopsis thaliana*, ostatní enzymy byly objeveny u různých rostlinných druhů. Převzato z Kuai a kol. (2018).

Degradace chlorofylu je úzce spojena s rozpadem pigment-proteinových komplexů a degradací CAB. Kritickou roli pravděpodobně hraje chlorofyl *b* reduktasa, která rozkládá chlorofyl *b*, čímž dochází k destabilizaci a zpřístupnění CAB proteasam.

Chen a kol. (2021) analyzovali pomocí imunoblottingu změny obsahu vybraných proteinů fotosystémů I a II u WT a *sgr* mutanta (mutace v genu STAY-GREEN (SGR) kódujícím  $Mg^{2+}$ -dechelatasa) rostliny *A. thaliana* během přirozené senescence a senescence indukované zatměním. Při přirozené senescenci byla u WT intenzita proteinových proužků na gelu u sedmitýdenních rostlin snížena, v 9. týdnu již bandy nebyly téměř viditelné. U *sgr* byly i v 9. týdnu pozorovány proužky pro proteiny jaderného komplexu PSI (CPI a PsaD), Lhca1, Lhcb2 a Lhcb4, proteiny jaderného komplexu (CP43 a D1) a komplex cytochrom *b<sub>6</sub>f* již nebyly detekovány. Podobné výsledky jako v devítitýdenních, přirozeně stárnoucích rostlinách byly pozorovány u oddělených listů WT a *sgr* inkubovaných 7 dnů ve tmě. Studie ukázala, že



i když byla potlačena degradace chlorofylu, nebyl zpomalen rozpad PSII a PSII vykazoval menší stabilitu než PSI.

Yang a kol. (2019) pozorovali ve své práci zabývající se degradací chlorofylu 7. den po zatemnění oddělených listů u WT *A. thaliana* ztrátu proteinů jaderného komplexu PSI (PsaA/B) i PSII (D1), LHCI (Lhca1, Lhca2, Lhca3) a LHCII (Lhcb6, Lhcb4), zůstal však patrný band pro Lhcb1. Rosiak-Figielek a Jackowski (2000) analyzovali pomocí imunoblottingu úbytek jednotlivých Lhcb proteinů u ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) během senescence indukované zatemněním. Po 6 dnech inkubace listů ječmene ve tmě byl pozorován úbytek obsahu proteinu Lhcb2.1 o 80 % a Lhcb3 o 58 %. Obsah proteinů Lhcb1, Lhcb4 a Lhcb6 byl i 6. den téměř shodný s obsahem těchto proteinů v čerstvých listech (0. den). U Lhcb2.2 a Lhcb5 dokonce došlo po 6. dnech inkubace ve tmě k nárůstu jejich obsahu o 81 a 20 %.

Pořadí degradace fotosystémů zřejmě závisí na rostlinném druhu. Zatímco u javoru cukrového (*Acer saccharum*) a dubu dvoubarevného (*Quercus bicolor*) byl pozorován dřívější nástup degradace PSI, u tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) a huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) byl naopak PSI ve srovnání s PSII stabilnější (Chen a kol. 2021).

Kromě proteolytických enzymů štěpících D1 protein reakčního centra PSII nejsou konkrétní proteasy zodpovědné za degradaci proteinů jaderného komplexu známy (Hörtensteiner 2006). Degradace podjednotky D1 probíhá ve dvou krocích. Nejprve dochází působením proteasy DegP2 k rozštěpení tohoto proteinu na dva fragmenty (o velikosti 10 kDa a 23 kDa), které následně rozkládají proteasy FtsH rodiny (Adam a Clarke 2002). Na degradaci světloběrného systému LHCII se podílí např. serinové a cysteinové proteasy, glutamyl endopeptidasy (odštěpují N-konce peptidů podjednotky Lhcb1) nebo metaloproteinasy vázající zinek (objevyeny při pozorování rozpadu podjednotky Lhcb3). O degradaci LHCII a její regulaci se stále ví velmi málo (Hörtensteiner 2006, Forsberg a kol. 2005, Zelisko a Jackowski 2004).

Kromě zmíněných proteas se degradace proteinů chloroplastů dále mohou účastnit tzv. vakuoly asociované se senescencí (SAVs; specifické lytické útvary sloužící k degradaci proteinů chloroplastů během senescence), ubiquitin/proteasomový systém (proteiny určené k zániku jsou označeny a následně rozloženy), tělíčka obsahující Rubisco (RCBs, Rubisco-containing bodies), autofagie celých chloroplastů a další (Ali a kol. 2018).

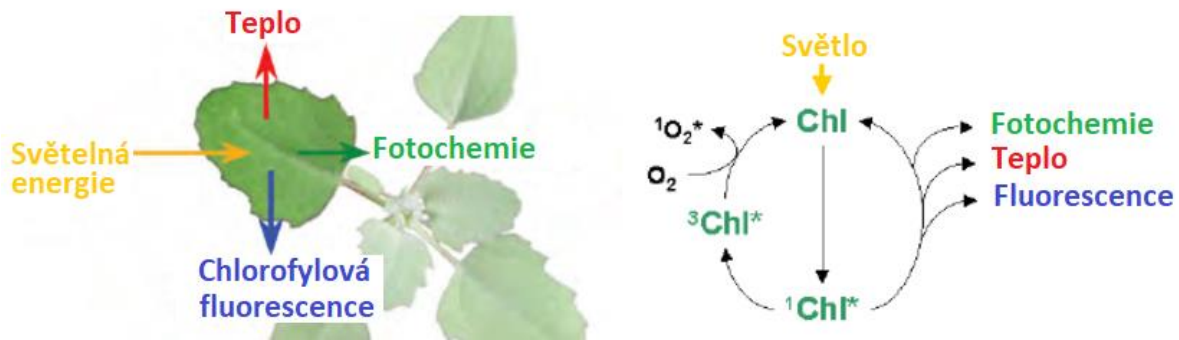
Degradaci chloroplastů pochopitelně doprovází inhibice fotosyntézy. Ta je způsobena potlačením Calvin-Bensonova cyklu (sekundární fotosyntetická fáze) a primární fotosyntetické reakce na tylakoidních membránách. Inhibice Calvin-Bensonova cyklu související zejména s poklesem aktivity a obsahu enzymu Rubisco většinou předchází zastavení primárních

fotosyntetických reakcí včetně PSII fotochemie. Přednostní inhibice stromálních reakcí pak zřejmě vede k akumulaci ROS a oxidativnímu poškození chloroplastů i celých buněk v důsledku nerovnováhy mezi tvorbou a spotřebou elektronů v elektronovém transportním řetězci (Camp a kol. 1982, Grover 1993, Špundová a kol. 2005a, Vlčková a kol. 2006, Sobieszczuk-Nowicka a kol. 2018).

### **2.3 Chlorofylová fluorescence**

Měření chlorofylové fluorescence je jednou z nejpoužívanějších technik v rostlinné fyziologii a ekofyziologii (Maxwell a Johnson 2000). Využívá se obzvláště při studiu vlivů abiotických a biotických faktorů na různé aspekty fotosyntetické aktivity a ukazuje se být přínosná také při studiu reakcí na světlo, jakožto důležitého regulačního faktoru fotosyntézy (Serôdio a kol. 2017).

Po absorpci světelné energie listem může dojít ke třem procesům, a to k fotosyntéze (fotochemie), chlorofylové fluorescenci nebo disipaci energie ve formě tepla (Maxwell a Johnson 2000) (Obr. 7). Mezi těmito třemi zmíněnými procesy dochází ke kompetici. Jakékoli zvýšení účinnosti jednoho procesu vede ke snížení výtěžku ostatních dvou (Misra a kol. 2012). Na chlorofylovou fluorescenci je využito pouze 1–2 % absorbované světelné energie. Fluorescenční spektrum se liší od absorpčního posunem píku emise fluorescence oproti píku absorpce světla směrem k vyšším vlnovým délkám. Chlorofylová fluorescence podává informace o stavu fotosystému II, konkrétněji o rozsahu, v jakém využívá energii absorbovanou molekulami chlorofylu a případně v jakém rozsahu je PSII poškozený přebytkem světla (Maxwell a Johnson 2000).



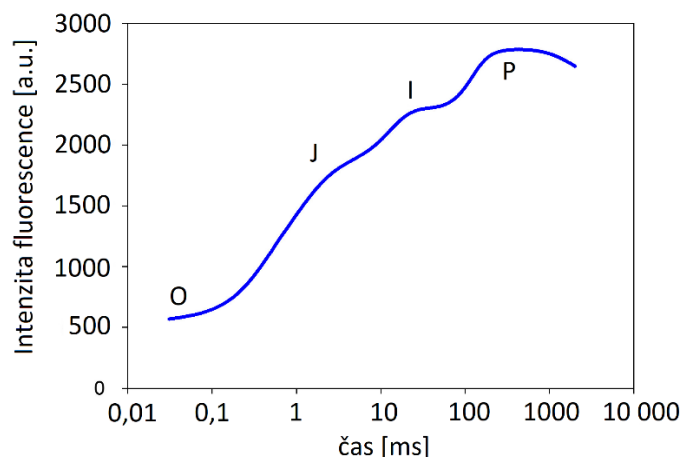
Obr. 7: Možné procesy, ke kterým může dojít po absorpci světelné energie listem. Jakmile chlorofyl absorbuje světelné záření, přechází ze základního stavu do singletového excitovaného stavu ( $^1\text{Chl}^*$ ). Existuje několik způsobů, jak relaxovat zpět z excitovaného do základního stavu. Excitační energie může být re-emitována jako chlorofylová fluorescence, využita k fotosyntetickým reakcím (qP, fotochemické zhášení) nebo disipována ve formě tepla (NPQ, nefotochemické zhášení). qP a NPQ obecně snižují množství vyzařované chlorofylové fluorescence. Chlorofyl v singletovém excitovaném stavu ( $^1\text{Chl}^*$ ) může přecházet do tripletového excitovaného stavu ( $^3\text{Chl}^*$ ).  $^3\text{Chl}^*$  má schopnost přenášet energii na kyslík a excitovat ho do singletového excitovaného stavu ( $^1\text{O}_2^*$ ), přičemž  $^1\text{O}_2^*$  patří mezi reaktivní formy kyslíku (Müller a kol. 2001). Převzato a upraveno z Misra a kol. (2012).

Jedním z nejvyužívanějších přístupů k měření chlorofylové fluorescence je fluorescenční indukce, kterou popisuje tzv. fluorescenční indukční křivka znázorňující zpočátku rychlý nárůst fluorescence následovaný pomalým poklesem fluorescence až do ustáleného stavu. Na základě této skutečnosti byly odvozeny dva typy metod. Prvním typem je měření rychlého nástupu fluorescence v krátkém čase a obvykle při vysoké intenzitě excitačního světla (rychlá fluorescenční indukce), tento děj popisuje tzv. OJIP křivka. Druhým typem je měření celého průběhu fluorescenční indukce, které probíhá po delší časový úsek a kdy jsou aplikovány různé typy světla (pomalá fluorescenční indukce) (Lazár 2015).

### 2.3.1 Rychlá fluorescenční indukce

Rychlá fluorescenční indukce je definována jako nárůst fluorescence chlorofylu zaznamenaný na předzatemněném rostlinném vzorku během prvních jednotek sekund poté, co byl tento vzorek vystaven krátkému působení záření (řádově sekundy). Pokud průběh intenzity fluorescence v rámci rychlé indukční kinetiky znázorníme v logaritmické časové škále, získáme tzv. OJIP křivku (Obr. 8). Bod „O“ označuje počáteční fluorescenci a odpovídá úrovni základní fluorescence  $F_0$ . Body „J“ a „I“ odrážejí krátkodobou rovnováhu mezi množstvím excitační energie absorbovaného záření v PSII a přenosem této energie pomocí redoxního stavu chinonů. Bod „P“ (angl. Peak) představuje maximální dosaženou hodnotu ( $F_P$ , odpovídá maximální hodnotě fluorescence dosažené při daném excitačním světle). Nárůst fluorescence chlorofylu z úrovně „O“ do úrovně „P“ odrážejí postupné hromadění redukováného chinonu ( $Q_A$ )

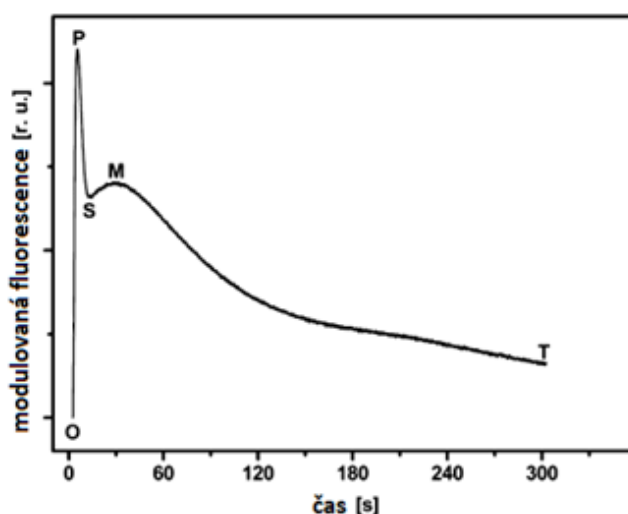
a pozastavení elektronového transportu systémem přenašečů v tylakoidní membráně chloroplastu (Barták 2011).



Obr. 8: Průběh rychlé indukční kinetiky fluorescence chlorofylu znázorněný pomocí křivky OJIP. Převzato a upraveno z Xia a kol. (2019).

### 2.3.2 Pomalá fluorescenční indukce

Pomalá fluorescenční indukce se dá definovat jako časová odezva fluorescence chlorofylu získaná na předzatměném listu během ozáření trvajícím řádově jednotky až desítky minut. Po ozáření vzorku je detekován velmi rychlý nárůst fluorescence na úroveň bodu P, poté dochází k postupnému poklesu do ustáleného stavu na úroveň bodu T (Obr. 9). Vzhledem k uvedenému časovému rozsahu měření odráží pomalá fluorescenční indukce kromě primárních (světelných) reakcí probíhajících v tylakoidní membráně a nefotochemického zhášení chlorofylové fluorescence také reakce sekundární (temnostní) fáze fotosyntézy (Calvin-Bensonův cyklus) (Barták 2011, Lazár 2015).



Obr. 9: Typický průběh pomalé fluorescenční kinetiky fluorescence chlorofylu změřený na předzatměných listech hrachu (*Pisum sativum*) vystavených červenému světlu o intenzitě  $40 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$  znázorněný pomocí tzv. OPSMT křivky. Převzato a upraveno z Lazár (2015).

Základními parametry získanými měřením pomalé fluorescenční indukce (doplněným o saturační pulzy) a nezbytnými pro výpočty některých dalších parametrů jsou:

- $F_0$  – minimální intenzita chlorofylové fluorescence vzorku adaptovaného na tmu, kdy jsou reakční centra PSII otevřená a všechny nefotochemické procesy v tylakoidní membráně minimalizovány.
- $F_M$  – maximální intenzita chlorofylové fluorescence vzorku adaptovaného na tmu, kdy jsou reakční centra PSII zavřená a všechny nefotochemické procesy v tylakoidní membráně minimalizovány.
- $F(t)$  – aktuální chlorofylová fluorescence v čase  $t$  indukovaná ozářením aktinickým světlem, kdy jsou reakční centra PSII částečně zavřená a všechny nefotochemické procesy v tylakoidní membráně jsou do určité míry aktivovány.
- $F_M'$  – maximální intenzita chlorofylové fluorescence vzorku adaptovaného na světlo, kdy jsou reakční centra PSII zavřená a všechny aktivní nefotochemické procesy v tylakoidní membráně optimalizovány (Roháček a Barták 1999).

### 2.3.3 Parametry chlorofylové fluorescence a jejich změny při senescenci

Ke studiu změn fotosyntézy (a to např. i změn fotosyntézy vyvolaných senescencí) se využívají specifické parametry chlorofylové fluorescence, mezi něž patří:

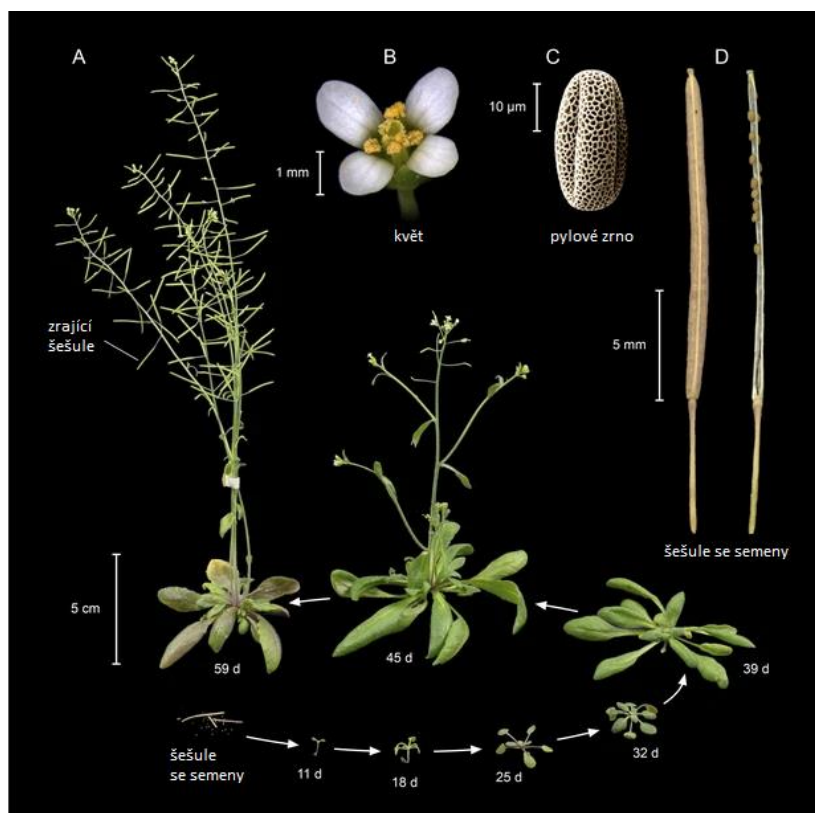
- $F_V/F_M$ , který označuje maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmu.  $F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M$ , kde  $F_M$  je maximální intenzita a  $F_0$  minimální intenzita fluorescence vzorku adaptovaného na tmu. Za normálních podmínek se hodnota tohoto parametru pohybuje okolo 0,8 a s postupující senescencí klesá.
- $\Phi_P$  znamenající efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na světlo.  $\Phi_P = (F_M' - F(t))/F_M'$ , kde  $F_M'$  je maximální intenzita fluorescence vzorku adaptovaného na světlo a  $F(t)$  je intenzita fluorescence v čase  $t$ .  $\Phi_P$  odráží, kolik absorbované světelné energie se využívá ve fotosyntetických procesech. S postupující senescencí klesá.
- $\Phi_{NPQ}$ , který je označením pro kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení. Rovnice výpočtu:  $\Phi_{NPQ} = F(t)/F_M' - F(t)/F_M$ . U senescentních rostlin v první fázi zpravidla

narůstá a v pozdější fázi klesá. U velmi stresovaných rostlin nemusí ochranné nefotochemické procesy téměř vůbec fungovat a  $\Phi_{NPQ}$  může být minimální, většinou současně s minimálním  $\Phi_P$  a vysokým  $\Phi_{f,D}$ .

- $\Phi_{f,D}$  značí kvantový výtěžek konstitutivních neregulačních disipačních procesů. Rovnice výpočtu:  $\Phi_{f,D} = F_{(t)}/F_M$ . U stresovaných vzorků dochází během fluorescenční indukce ke zpomalení a inhibici standardního poklesu, tj.  $\Phi_{f,D}$  vykazuje vyšší hodnoty v ustáleném stavu. Tento průběh nastává většinou až u hodně stresovaných vzorků a bere se jako indikátor výrazného poškození PSII.

## 2.4 *Arabidopsis thaliana* a jeho „lhcb“ mutanti

*Arabidopsis thaliana* neboli huseníček rolní je jednoletá nebo ozimá bylina s výskytem téměř po celém světě. Dorůstá výšky 5–30 cm. Lodyha je přímá a často větvená. Listy rostou v přízemní růžici. Květy tvoří hrozen a jsou bílé. Plodem je šešule (Obr. 10). *Arabidopsis thaliana* se řadí do čeledi *Brassicaceae* neboli brukvovité, která zahrnuje také ekonomicky důležité zemědělské plodiny jako je např. zelí, brokolice, ředkev nebo řepka. Využívá se jako modelový organismus v molekulární genetice, fyziologii a biochemii rostlin vzhledem k následujícím vlastnostem: malá velikost genomu (v roce 2000 se stal první rostlinou, jejíž genom byl kompletně osekvenován; sekvenace genomu huseníčku odhalily cca 26 000 strukturních genů), malý počet chromozomů (5), snadná kultivovatelnost, krátký životní cyklus (asi 6 týdnů), velký počet potomků (z jedné rostliny až 1000 semen), schopnost samosprašení i cizosprašení a rozsáhlá kolekce mutantních linií. Pro svůj krátký životní cyklus a listy procházející snadno rozlišitelnými vývojovými fázemi je *Arabidopsis thaliana* oblíbeným modelem také pro studium listové senescence (Hejny a kol. 2003, <https://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>).



Obr. 10: Životní cyklus *Arabidopsis thaliana* pěstovaného za podmínek 16 h světlo/8 h tma. (A) *A. thaliana* ekotyp Columbia-0 v různých fázích životního cyklu – od semene (vlevo dole) přes semenáček (stáří 11 dní), vegetativní období rostliny (stáří 39 dní) až k reprodukčnímu období rostliny (stáří 45 dní). Fotografie (B) znázorňuje květ, (C) pylové zrno a (D) zralou šišuli (vlevo: zavřená šišule; vpravo: otevřená šišule s několika semeny). Převzato a upraveno z Krämer (2015).

Při přípravě knockout mutantů *Arabidopsis thaliana* se nejčastěji využívá metoda inzerční mutagenese pomocí transferové DNA (T-DNA) pocházející z Ti-plazmidu, který se vyskytuje u *Agrobacterium tumefaciens*. Další možností přípravy knockoutů je použití transpozonů (Dostálová 2020). Následující podkapitoly pojednávají o „lhcb“ knockout mutantech rostliny *Arabidopsis thaliana* použitých v rámci experimentální části této diplomové práce.

#### 2.4.1 koPsbS

Funkce PsbS proteinu zkoumali Li a kol. (2000) prostřednictvím tzv. *npq4* mutantu, který postrádá právě tento protein. *Npq4* mutant vykazoval výrazný defekt v qE (zhášení závislé na energii) složce NPQ. Bylo zjištěno, že u něj nedochází ke konformačním změnám v rámci tylakoidní membrány závislým na pH a zeaxantinu, které jsou nezbytné pro qE. Celkový obsah zeaxantinu byl však v normě. Absorpce světla a fotosyntéza nebyly zjevně ovlivněny. Maximální kvantový výtěžek PSII stanovený měřením chlorofylové fluorescence vykazoval

normální hodnoty. Rostlina tohoto mutanta byla vzhledově k nerozeznání od rostlin standardního genotypu (WT). Byly u něj přítomny všechny periferní světlosběrné antény PSII Lhcb1–Lhcb6. Touto studií se autorům podařilo potvrdit účast PsbS proteinu při iniciaci nefotochemického zhašení sloužícího k fotoprotekci rostliny.

Práce od Caffari a kol. (2009), jež se zabývala jednotlivými komponentami fotosystému II, ukázala, že PsbS protein stabilně neasociuje s PSII superkomplexem a jeho přítomnost tak zřejmě neovlivňuje interakce mezi jádrem a vnějšími anténami, výskyt tohoto proteinu je pak v rámci superkomplexu buď přechodný, nebo je lokalizován periferně v membránových oblastech obohacených o LHCII.

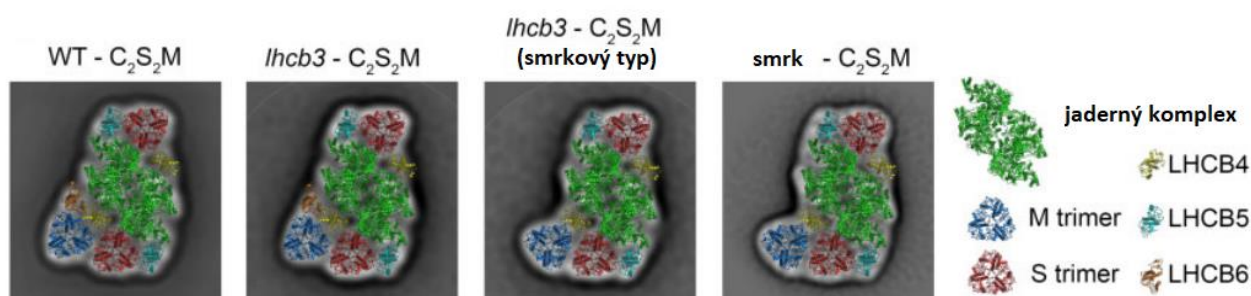
Wang a kol. (2015) zkoumali funkční změny u vybraných mutantů s deficiencí proteinů fotosyntetického aparátu rostliny *Arabidopsis thaliana* během přirozené a senescence indukované tmou, kdy jedním s testovaných genotypů byl mutant s deficiencí PsbS proteinu. Během přirozené senescence nebyly u *koPsbS* pozorovány ve srovnání s WT rozdíly v obsahu chlorofylu ani množství ROS. Došlo však ve srovnání s WT k výraznému poklesu hodnot parametrů chlorofylové fluorescence  $q_N$  (koeficient nefotochemického zhašení) a  $\Phi_P$ , u parametru  $1 - q_P$  byly hodnoty zvýšeny. V rámci experimentu byla senescence indukována zatemněním rostlin po dobu 3, 7 a 10 dnů, kdy nejvyšších pokles obsah chlorofylu byl u všech genotypů pozorován při zatemnění po dobu 10 dnů.

### 2.4.2 *koLhcb3*

Ve srovnání s WT nevykazoval *koLhcb3* rozdíly v rychlosti růstu či obsahu fotosyntetických pigmentů. Dále nebyly pozorovány žádné rozdíly v hodnotách parametrů  $F_0$ ,  $F_M$ ,  $F_v/F_M$ ,  $q_P$  a  $\Phi_{PSII}$ , což naznačuje, že funkce PSII u tohoto mutanta nebyla nijak ovlivněna. Analýza rychlosti oxidace P700 ukázala, že ve srovnání s WT nedošlo k žádným významným změnám ve funkční velikosti PSI antén. Prozkoumávána byla také formace a relaxace  $q_E$ , přičemž absence Lhcb3 se výrazně neprojevila na kinetice ani celkové amplitudě  $q_E$  (Damkjær a kol. 2009). Další analýza ukázala, že nepřítomnost Lhcb3 byla kompenzována zvýšeným výskytem podjednotek Lhcb1 a Lhcb2, přičemž tvorba superkomplexu  $C_2S_2M_2$  byla zachována. Pozice M trimeru byla v  $C_2S_2M_2$  pozměněna, ale jeho vazba (i když velmi slabá) k  $C_2$  byla stále zprostředkována pomocí Lhcb6 (Damkjær a kol. 2009). Ilíková a kol. (2021) zaznamenali přítomnost PSII superkomplexů typu  $C_2S_2/C_2SM$  a  $C_2S_2M$ , výskyt  $C_2S_2M_2$  superkomplexu však nepozorovali. Obrazová analýza odhalila dokonce dvě formy superkomplexu  $C_2S_2M$ . U první formy (tvořila asi 90 %) se M trimer vázal k jádru PSII pomocí podjednotek Lhcb4 a



Lhcb6. Tato forma superkomplexu byla podobná  $C_2S_2M$  přítomnému u WT, jediným rozdílem byla změna polohy M trimernu vzhledem k S trimernu (pootočení asi o  $10^\circ$ ). U druhé formy se M trimer vázal k jádru PSII pouze pomocí podjednotky Lhcb4. Podrobnější analýza této formy superkomplexu odhalila, že pozice normálně obsazená Lhcb6 proteinem byla prázdná. Struktura této formy superkomplexu se velmi podobala  $C_2S_2M$  superkomplexu přítomnému u smrku ztepilého (forma „smrkového typu“) (Obr. 11).



Obr. 11: Strukturální modely superkomplexu typu  $C_2S_2M$  u WT, *koLhcb3* (*Arabidopsis thaliana*) a smrku (*Picea abies*). Převzato a upraveno z Ilíková a kol. (2021).

### 2.4.3 *koLhcb6*

Rostliny *koLhcb6* byly ve srovnání s WT menší, avšak hladiny fotosyntetických pigmentů byly přibližně stejné (Kovács a kol. 2006, de Bianchi a kol. 2008). Byly naměřeny mírně snížené hodnoty parametru  $F_V/F_M$  a zvýšené hodnoty parametru  $F_0$ . Vzhledem k absenci minoritní antény Lhcb6 došlo pravděpodobně k oslabení vazby mezi M trimery a jádrem PSII, a tak k méně efektivnímu přenosu energie do reakčních center PSII, což vysvětluje zvýšení hodnot parametru  $F_0$ . Dále bylo pozorováno dramatické snížení hodnot parametru NPQ. Kovács a kol. (2006) na základě těchto výsledků vyslovili hypotézu, že Lhcb6 přímo interaguje s PsbS proteinem a hraje tak podstatnou roli při NPQ. Tato hypotéza neodpovídá výsledkům práce Dostálová (2020), kdy byl u průběhu NPQ *koLhcb3koLhcb6* pozorován typický počáteční nárůst (jako u WT), zatímco u *koLhcb3koLhcb6koPsbS* se hodnoty držely velmi nízko, z čehož bylo zřejmé, že PsbS protein hraje důležitou roli při indukcii NPQ i u mutantů bez Lhcb6. Ukázalo se, že byl omezen přenos elektronů v rámci PSII, a to v oblasti mezi  $Q_A$  a komplexem cytochrom *b6f*. Dále byl u *koLhcb6* pozorován zvýšený výskyt podjednotek Lhcb1 a Lhcb2 a mírně snížený počet Lhcb3 podjednotek. Hlavním typem superkomplexu vyskytujícím se u *koLhcb6* byl  $C_2S_2$ , tvorba  $C_2S_2M_2$  superkomplexu nebyla pozorována, z čehož bylo usouzeno, že Lhcb6 je důležitý pro vazbu M trimernu k  $C_2$ .  $C_2S_2$  měl schopnost organizace do semikrystalických domén (Kovács a kol. 2006, de Bianchi a kol. 2008, Chen a kol. 2018, Dostálová 2020, Ilíková a kol. 2021). Podle de Bianchi a kol. (2008) nebylo narušení

fotosyntézy primárně způsobeno ztrátou Lhcb6 proteinu, ale uspořádáním velké části PSII právě do semikrystalických domén, což může omezovat difúzi plastochinonu (PQ) mezi PSII a PSI.

#### **2.4.4 *koLhcb3koLhcb6***

Přírozně došlo ke ztrátě podjednotek Lhcb3 a Lhcb6 u smrku ztepilého (*Picea abies*), výsledkem čehož je vznik unikátní struktury C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub> superkomplexu. Ilíková a kol. (2021) provedli strukturní a funkční charakterizaci PSII superkomplexů u mutantů *Arabidopsis thaliana koLhcb3*, *koLhcb6* a *koLhcb3koLhcb6*, aby prozkoumali možnost tvorby PSII superkomplexu „smrkového typu“ také u krytosemenných rostlin.

Rostliny *koLhcb3koLhcb6* byly ve srovnání s WT viditelně menší, obsah fotosyntetických pigmentů však byl téměř shodný. Použitím hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že ztráta Lhcb3 a Lhcb6 proteinů vede ke zvýšení zastoupení podjednotek Lhcb1 a Lhcb2. Hlavním pozorovaným typem PSII superkomplexu byl C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, přičemž byl (z 80–100 %) organizován do semikrystalických domén. PSII superkomplexy „smrkového typu“ nebyly u tohoto dvojitého mutantu pozorovány, i přesto se zde zřejmě mohou vytvářet. Autoři chtěli zjistit, zdali se volné M trimery nevážou k PSII v rámci semikrystalických domén, a proto se rozhodli odhadnout efektivní velikost anténního komplexu PSII pomocí měření indukčních křivek fluorescence chlorofylu. Hodnoty parametru F<sub>v</sub>/F<sub>M</sub> byly sníženy, což bylo dáno vyššími hodnotami F<sub>0</sub> a nižšími hodnotami F<sub>M</sub>. Za zvýšení hodnot parametru F<sub>0</sub> byly pravděpodobně zodpovědné nenavázané LHCI. Efektivní velikost antén stanovená z O–J fáze OJIP křivky (TR<sub>0</sub>/RC parametr) však vykazovala zvýšení, což napomohlo k vyvození závěru, že volné LHCI (včetně M trimerů) jsou nějakým způsobem funkčně propojeny s PSII semikrystalickými doménami. Dále tito mutantů vykazovali rychlou aktivaci tzv. fotosyntetické kontroly (tj. zpomalení toku elektronů na úrovni komplexu cytochrom *b<sub>6</sub>f* v důsledku okyselení lumenu tylakoidů vyvolaného cyklickým tokem elektronů okolo PSI), která může chránit PSI před fotoinhibicí při náhlém zvýšení intenzity světla. Mutanti vykazovali také rychlou indukci NPQ chránící PSII před přeexcitováním. Oba pozorované jevy jsou pravděpodobně spojeny s přechodným omezením transportu elektronů mezi PSII a PSI způsobeným semikrystalickým uspořádáním PSII superkomplexu C<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (Ilíková a kol. 2021).

#### **2.4.5 *koLhcb4.1koLhcb4.2koLhcb4.3***

Vliv absence Lhcb4 proteinu na makrostrukturu PSII a na fotoprotekci zkoumali de Bianchi a kol. (2011). S ohledem na standardní genotyp (WT) *koLhcb4* nevykazoval významné snížení růstu. *KoLhcb4* se nelišil od WT v obsahu chlorofylu vztaženého na plochu listu a poměru Chl/Car, došla však ke snížení hodnot poměru chl *a/b*. Analýza fluorescenční indukce u listů adaptovaných na tmu tohoto mutantu odhalila zvýšené hodnoty parametru  $F_0$  a snížené hodnoty parametru  $F_v/F_M$  ve srovnání s WT. V nepřítomnosti proteinu Lhcb4 tedy dochází k oslabení spojení mezi jádrem a LHCII komplexem PSII a více absorbované energie je pak emitováno v podobě fluorescence. Funkce transportního řetězce elektronů byla zachována. Rostliny bez Lhcb4 vykazovaly sníženou kapacitu fotoprotekce při vystavení vysokému ozáření. Obvykle při absenci nějaké podjednotky Lhcb dochází ve zvýšené míře k akumulaci jiných podjednotek, to však neplatilo u *koLhcb4*, kde došlo dokonce ke ztrátě Lhcb6 podjednotky. I přes ztrátu těchto podjednotek dochází ke vzniku  $C_2S_2$  a  $C_2S_2M_2$  superkomplexů, kde jsou však výrazně oslabeny vazby mezi jádrem a LHCII trimery a kdy dochází k pozměnění jejich tvaru. Autoři došli k závěru, že protein Lhcb4 je podstatnou součástí PSII sloužící k udržení funkce i struktury tohoto fotosystému (de Bianchi a kol. 2011, Chen a kol. 2018).

#### **2.4.6 *koLhcb5***

Chen a kol. (2018) sledovali u *koLhcb4*, *koLhcb5* a *koLhcb6* rostlin *Arabidopsis thaliana* jejich výkonnost ve fotosyntéze a fotoprotekci. Mutantní rostliny *koLhcb5* staré 4 týdny nevykazovaly ve srovnání s WT redukcí ve velikosti. Obsah chlorofylu a hodnoty parametrů  $F_v/F_M$ ,  $\Phi_{PSII}$ , NPQ a qP byly podobné hodnotám pro WT. Podobné hodnoty NPQ u *koLhcb5* a WT mohly být dány zvýšením hladiny PsbS proteinu u *koLhcb5*. Dříve bylo zjištěno, že Lhcb5 může hrát roli při iniciaci qI (fotoinhibiční zhášení, složka NPQ) (Dall'Osto a kol. 2005). Vystavení rostliny světlu vyšší intenzity bylo ve větší míře doprovázeno tvorbou ROS, zároveň došlo ve srovnání se standardním genotypem (WT) k akumulaci většího množství antokyanů. Dall'Osto a kol. (2014) potvrdili podstatnou roli Lhcb5 proteinu při formaci PSII superkomplexů (u mutantů *Arabidopsis thaliana* bez proteinu Lhcb5 byly vazby mezi jaderným komplexem a S trimery nestabilní).

#### **2.4.7 *koLhcb5koLhcb6***

Jedním z mutantních genotypů, pomocí kterého studovali Dall'Osto a kol. (2014) vliv absence některých minoritních světloběrných antén na přenos excitační energie, byl *koLhcb5koLhcb6* (koCP26/24). Souhrnně autoři o tomto genotypu zjistili, že se u něj k jadernému komplexu PSII pravděpodobně přímo připojuje jen jeden trimer, zatímco ostatní jsou volně rozptýleny v oblasti superkomplexu, navzdory tomu byla poměrně dobře zachována funkce elektronového transportního řetězce a čtyřtýdenní rostliny nevykazovaly významné snížení růstu ve srovnání s rostlinami standardního genotypu (WT). De Bianchi a kol. (2008) pozorovali u tohoto dvojitého mutantu změny v zastoupení majoritních světloběrných antén, kdy došlo u Lhcb3 k poklesu o 55 %, naopak Lhcb1 a Lhcb2 se zde vyskytovaly ve vyšším počtu (nárůst o 65 % a 15 %). Zaregistrován byl také pokles obsahu podjednotky Lhcb4 (CP29). Na základě zvýšených hodnot  $F_0$  byl taktéž vyvozen závěr, že je narušeno spojení mezi jádrem PSII a trimery LHCII.

#### **2.4.8 *koLhcb4.1koLhcb4.2koLhcb5* („NoM“; no minor antennae mutant)**

Funkční charakterizaci knockout linie NoM bez minoritních světloběrných antén Lhcb4.1, Lhcb4.2 a Lhcb5 provedli v rámci své práce Dall'Osto a kol. (2014). Autoři např. pozorovali, že čtyřtýdenní mutantní rostliny NoM (pěstované za podmínek: 100  $\mu\text{mol}$  fotonů  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 23 °C, 8/16 den/noc) vykazovaly poměrně významnou redukci růstu ve srovnání se standardním genotypem (WT). Pozorovány byly také snížené hodnoty některých funkčních parametrů jako např. maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmou a obsahu fotosyntetických pigmentů. Závěrečným zjištěním této práce bylo, že u NoM mutantů je porušeno funkční spojení světloběrných komplexů LHCII s jádry PSII a že minoritní antény jsou nezbytné k formaci makrostruktur PSII. Townsend a kol. (2018) zjistili na základě studia nefotochemického zhášení u genotypu NoM, že pro NPQ není nutná přítomnost minoritních světloběrných antén.

#### **2.4.9 *koLhcb3koLhcb6koLhcb4.1koLhcb4.2koLhcb4.3* („Penta“)**

Tento genotyp byl poprvé připraven Mgr. Ivou Ilíkovou Ph.D. v Ústavu experimentální botaniky Akademie věd ČR a doposud o něm nebyly zveřejněny žádné informace.

## 2.5 Motivace diplomové práce

Míra a pořadí degradace světlosběrných komplexů a dalších komponent fotosyntetického aparátu závisí na podmínkách senescence a rostlinném druhu, přičemž mechanismus této degradace doposud nebyl objasněn. Při senescenci zpravidla nejprve dochází k inhibici reakcí probíhajících ve stromatu a později i reakcí probíhajících v tylakoidní membráně, současně však hrozí nebezpečí akumulace ROS a oxidativního poškození v důsledku nerovnováhy v příjmu a využití excitační energie. Rychlost, míra a pořadí degradace LHC mohou být důležité vzhledem k potřebě zachování nízké míry poškození chloroplastů a buněk za účelem efektivní recyklace látek při senescenci. Je známo, že mutantní rostliny s deficiencí některých LHC mají ovlivněnou organizaci, funkci a stabilitu fotosyntetického aparátu, nicméně jejich senescence dosud nebyla popsána. Vzhledem k těmto skutečnostem se předložená diplomová práce věnuje vlivu deficience vybraných světlosběrných komplexů a PsbS proteinu na průběh listové senescence *Arabidopsis thaliana* vyvolané zatemněním listů.

### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Rostlinný materiál

Při prováděných experimentech byla použita modelová rostlina *Arabidopsis thaliana* L. Jednalo se o rostliny genotypu WT (wild type; ekotyp Columbia, Col-0) a dalších 9 genotypů s deficiencí genů kódujících určité proteiny fotosystému II, konkrétně:

- *koPsbS*,
- *koLhcb5koLhcb6* (v práci označován jako *koLhcb5,6*),
- *koLhcb3*,
- *koLhcb6*,
- *koLhcb3koLhcb6* (v práci označován jako *koLhcb3,6*),
- *koLhcb4.1koLhcb4.2koLhcb4.3* (v práci označován jako *koLhcb4*),
- *koLhcb5*,
- *koLhcb4.1koLhcb4.2koLhcb5* (v práci označován jako NoM; zkratka odvozena z angl. no minor antennae mutant) a
- *koLhcb3koLhcb6koLhcb4.1koLhcb4.2koLhcb4.3* (v práci označován jako Penta).

Semínka výše uvedených genotypů *A. thaliana* (poskytnutá Mgr. Ivou Ilíkovou Ph.D.) byla namočena do deionizované vody a inkubována 3 dny v ledničce při teplotě 4 °C. Následně byla semínka zaseta do malých květináčů se substrátem Potgrond H (Klasmann-Deilmann, Německo) a zalita deionizovanou vodou. Květináče byly umístěny do fytotronu s pěstebními podmínkami: 8 h světlo (100  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )/16 h tma, 22°C/20°C, relativní vlhkost vzduchu 60 %. Rostliny byly pravidelně zalévány vodou z vodovodního řádu. Po 2–3 týdnech byly rostliny rozesazeny do větších květináčů (7x7 cm) tak, aby se v každém nacházela jen jedna rostlina. Od každého genotypu bylo takto napěstováno asi 15 rostlin. Experiment byl proveden celkem třikrát (v květnu 2021, v listopadu 2021 a v únoru/březnu 2022), a to s různými modifikacemi (viz. dále).

Po 6 týdnech bylo z rostlin každého genotypu odděleno přibližně 12 listů (vždy 7.–9. list na rostlině), které byly vloženy po dvou do 6-jamkové mikrotitrační destičky, kde se v každé jamce nacházelo 5 ml deionizované vody. Destičky s listy byly poté vloženy do větší krabice, která byla obalena černou folií a inkubována při teplotě 21 °C po dobu 5 dní. V experimentu 2 bylo od každého genotypu odděleno a vloženo do mikrotitračních destiček dalších 12 listů, které byly inkubovány po dobu 5 dnů na kontinuálním světle (60  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a teplotě 21 °C ve fytokomoře Algaetron (PSI, Česká republika).

V rámci experimentu 1 bylo u rostlin každého genotypu provedeno také individuální zatemnění vždy dvou vybraných listů (IDL) pomocí alobalu. Rostliny s IDL byly umístěny zpět do fytotronu (8 h světlo ( $100 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )/16 h tma,  $22^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$ , relativní vlhkost vzduchu 60 %) po dobu 5 dní.

### **3.2 Chemikálie**

Aceton (VWR chemicals, USA)

Uhličitan hořečnatý ( $\text{MgCO}_3$ ) (Sigma-Aldrich, USA)

### **3.3 Přístrojové vybavení**

DualPAM100 (Walz, Německo)

FluorCam FC 800-0 (PSI, Drásov, ČR)

Unicam UV 550 (Thermo Spectronic, Cambridge, Velká Británie)

Centrifuga Sigma 3-30K (Sartorius, Německo)

### **3.4 Software pro zpracování výsledků**

FluorCam (PSI, Drásov, ČR)

Microsoft Office Excel (MS Office, USA)

ImageJ (online)

### **3.5 Statistická analýza dat**

Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit program Microsoft Office Excel (MS Office, USA). Statistická významnost rozdílů mezi absolutními hodnotami z 0. a 5. dne u jednotlivých genotypů byla vyhodnocena pomocí nepárového t-testu. V grafickém zpracování jsou statisticky významné rozdíly ( $p \leq 0,05$ ) označeny nad jednotlivými sloupci hvězdičkou (\*).

### **3.6 Použité metody**

#### **3.6.1 Analytické stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů**

Listy s přísávkem  $\text{MgCO}_3$  byly rozetřeny v třecí misce. Následně bylo přidáno 750  $\mu\text{l}$  vychlazeného 80% acetonu a získaný homogenát byl přelit do mikrozkušavky. Třecí miska s tloučkem byly opláchnuty dalšími 750  $\mu\text{l}$  80% acetonu, který byl se zbytky homogenátu přidán do mikrozkušavky. Několik takto připravených homogenátů bylo centrifugováno

po dobu 10 minut při 6000 g a 4 °C. Získané supernatanty byly přelity do zkumavek se stupnicí. Supernatanty byly v případě potřeby (tak, aby se absorbance u vlnové délky 663,2 nm pohybovala v rozmezí hodnot 0,4–0,8) naředěny 80% acetonem. Celkový objem v jednotlivých zkumavkách byl zaznamenán. Dále bylo pomocí dvoupaprskového spektrofotometru Unicam UV550 (Thermo Spectronic, Rochester, USA) provedeno spektrofotometrické stanovení absorbance při vlnových délkách 470 nm, 646,8 nm, 663,2 nm a 750 nm. Tloušťka skleněné kyvety byla 1 cm. Obsah jednotlivých pigmentů byl vypočítán podle rovnic dle Lichtenthalera (1987):

#### **Chlorofyl a:**

$$\text{chl a} = \frac{(12,25 \cdot (A_{663,2} - A_{750}) - 2,79 \cdot (A_{646,8} - A_{750})) \cdot V}{S} \quad [\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}]$$

#### **Chlorofyl b:**

$$\text{chl b} = \frac{(21,5 \cdot (A_{646,8} - A_{750}) - 5,1 \cdot (A_{663,2} - A_{750})) \cdot V}{S} \quad [\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}]$$

#### **Karotenoidy:**

$$\text{car} = \frac{((1000 \cdot (A_{470} - A_{750}) - 1,82 \cdot (\text{chl a}) - 85,02 \cdot (\text{chl b}))/198) \cdot V}{S} \quad [\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}]$$

$A$  označuje absorbanci při daných vlnových délkách,  $V$  je objem chlorofylového extraktu v ml a  $S$  je plocha listu v  $\text{cm}^2$ , která byla zjištěna v programu ImageJ po obkreslení listů na folii.

S pomocí MS Excel byly dále vypočítány obsahy chl  $a + b$  a chl  $a/b$ .

Příprava chlorofylové extraktu i samotné spektrofotometrické stanovení bylo prováděno za slabého zeleného světla.

### **3.6.2 Měření parametrů chlorofylové fluorescence**

#### **3.6.2.1 FluorCam**

Během experimentů byly kontrolní listy před měřením adaptovány 30 minut na tmou. Oddělené listy byly svrchní stranou nahoru vyskládány na podložku z černého papíru (3–4 genotypy najednou). V případě IDL byl ze zatemňovaných listů odstraněn alobal a rostliny jednotlivých genotypů byly po jedné umísťovány pod CCD kameru přístroje. Před spuštěním měření bylo provedeno zaostření kamery. Práce s listy byla prováděna při slabém zeleném světle. Pomocí pulzů měřicího světla byly změřeny hodnoty parametru  $F_0$ , pomocí saturačního pulzu pak hodnoty parametru  $F_M$ . Bylo zapnuto aktinické světlo a v časech 0,17, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 10 minut byly aplikovány saturační pulzy umožňující změření  $F_M'$  a stanovení hodnot



fluorescenčních parametrů během přechodu fotosyntetického aparátu ze stavu adaptovaného na tmu do stavu adaptovaného na světlo. Po 10 minutách bylo aktinické světlo vypnuto a v časech 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 a 20 minut (počítáno od zapnutí aktinického světla) byly aplikovány saturační pulzy ke stanovení hodnot fluorescenčních parametrů během jejich relaxace ve tmě. V jednotlivých experimentech byla použita různá intenzita aktinického světla:

- Experiment 1: přibližně  $1200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- Experiment 2: přibližně  $200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- Experiment 3: přibližně  $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

V případě měření IDL (po 5 dnech od zatemnění vybraných listů) v rámci experimentu 1 byla z technických a časových důvodů použita zkrácená procedura (přibližně 7 minut bylo zapnuto aktinické světlo, saturační pulzy byly aplikovány v časech 3, 26, 49, 72, 95, 118, 141, 188, 235, 282, 352 a 422 sekund).

Po měření byly oddělené listy vyfoceny. Stejný postup měření parametrů chlorofylové fluorescence byl opakován po 5 dnech inkubace ve tmě/na světle na oddělených listech z mikrotitračních destiček. Po změření fluorescenčních parametrů na přístroji FluorCam během experimentů 1 a 2 byly listy určené k následovnému stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů obkresleny na průhlednou folii, vloženy do 2ml mikrozkušavek, zmrazeny tekutým dusíkem a uchovány v mrazicím boxu při teplotě  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.6.2.2 DualPAM**

Pro posouzení funkce PSI bylo v rámci experimentu 3 použito měření oxidace P700 pomocí přístroje DualPAM100 (Walz, Německo) během 3 min po spuštění aktinického světla (červené světlo,  $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). V časech 11, 38, 70, 90, 120 a 180 sekund byly aplikovány pulsy saturačního světla (červené,  $10\,000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a pomocí přístrojového softwaru vypočteny následující parametry: Y(I) – efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSI, Y(ND) – kvantový výtěžek nefotochemické disipace energie daný limitací na donorové straně PSI a Y(NA) – kvantový výtěžek nefotochemické disipace energie daný limitací na akceptorové straně PSI (Klughammer a Schreiber 2008). Kontrolní listy byly před samotným měřením adaptovány na tmu po dobu 30 minut. Práce s listy byla prováděna opět při slabém zeleném světle. Po změření fluorescenčních parametrů na přístroji DualPAM byly listy určené k následovnému stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů obkresleny na průhlednou folii, vloženy do 2ml mikrozkušavek, zmrazeny tekutým dusíkem a uchovány v mrazicím boxu

při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Stejný postup měření oxidace P700 a následného zamrazení listů po měření byl opakován po 5 dnech na oddělených listech z mikrotitračních destiček.

## 4 VÝSLEDKY

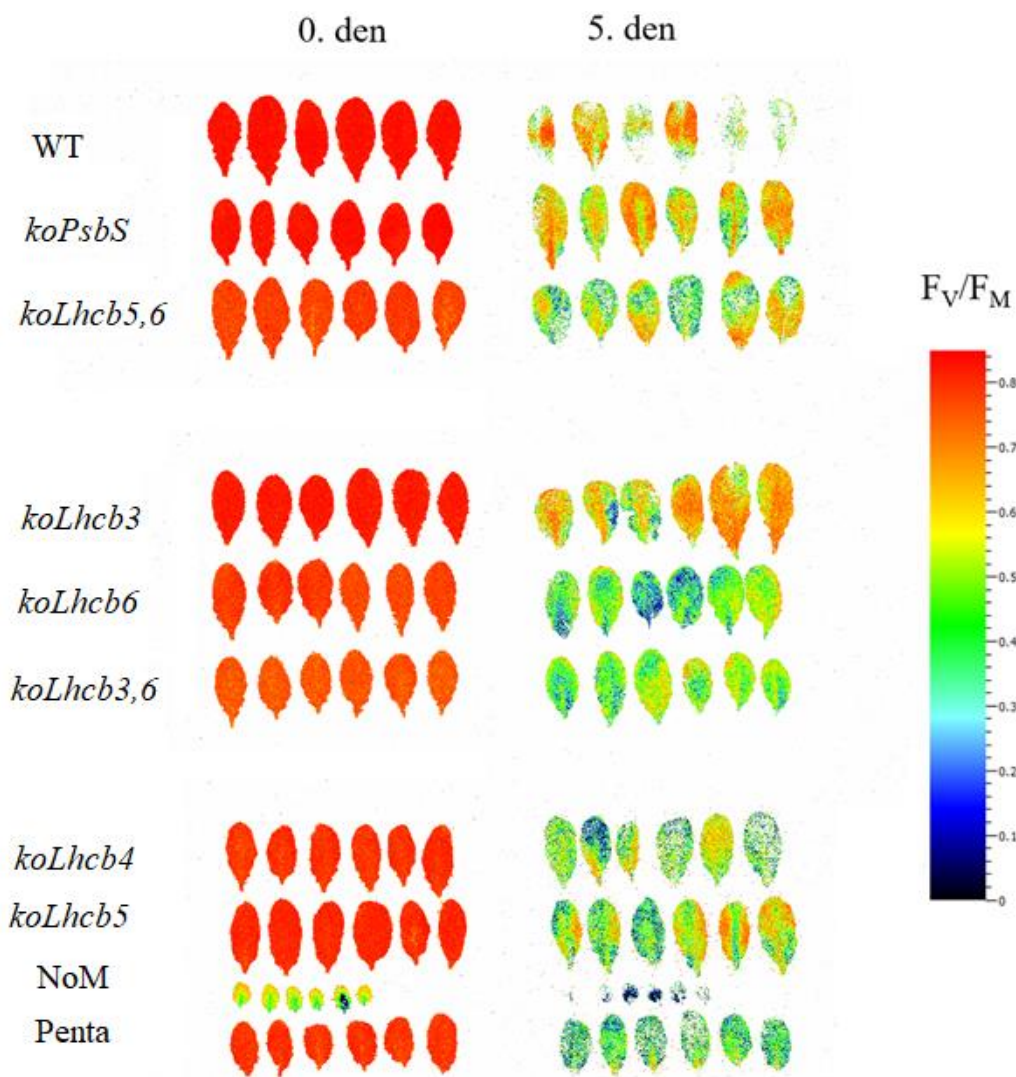
### 4.1 Experiment 1

V rámci experimentu 1 bylo provedeno analytické stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů a měření parametrů chlorofylové fluorescence u oddělených listů a individuálně zatemněných (IDL) listů 10 genotypů rostliny *A. thaliana* L., a to bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě, nebo v případě IDL 5. den po zatemnění. Při měření chlorofylové fluorescence pomocí přístroje FluorCam byly sledovány parametry  $F_V/F_M$ ,  $F_0$ ,  $F_M$ ,  $\Phi_P$ , NPQ a  $1 - q_P$  a bylo použito aktinické světlo o intenzitě  $1200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

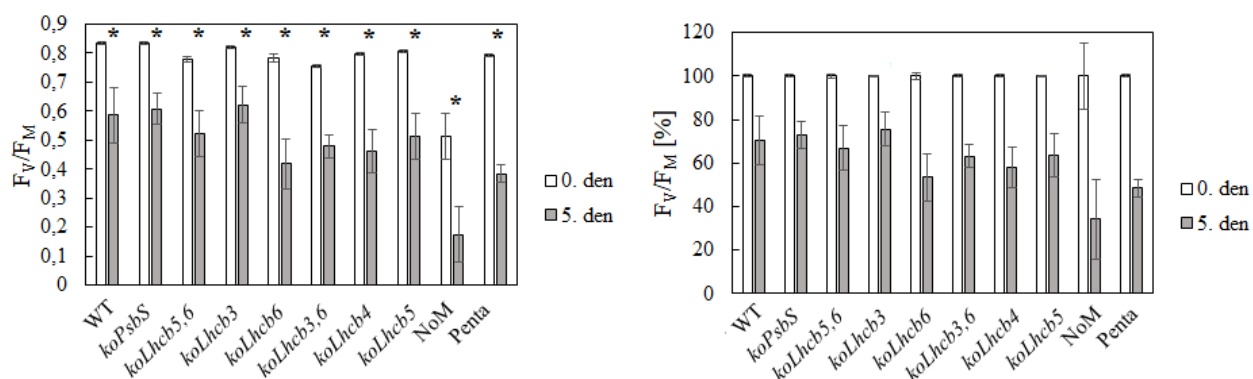
#### 4.1.1 Oddělené listy

##### 4.1.1.1 Obrazové záznamy parametrů $F_V/F_M$ , $F_0$ a $F_M$

Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmu ( $F_V/F_M$ ) vyjadřující funkčnost PSII se u kontrolních listů všech genotypů (0. den), s výjimkou genotypu NoM, pohyboval okolo hodnoty 0,8. U genotypu NoM byl parametr  $F_V/F_M$  snížen na hodnotu 0,5 (ve srovnání s ostatními genotypy snížení asi o 40 %). Po inkubaci oddělených listů 5 dnů ve tmě došlo k poklesu parametru  $F_V/F_M$  u všech genotypů na hodnoty 0,2–0,6. Nejvyšší pokles byl pozorován u genotypů *koLhcb6*, *koLhcb3,6* a NoM (ve srovnání s kontrolou snížení o 40–70 %). Naopak nejnižší pokles hodnot tohoto parametru byl zaznamenán u genotypů WT, *koPsbS* a *koLhcb3*. Hodnoty  $F_V/F_M$  byly u jednotlivých listů inkubovaných 5 dnů ve tmě heterogenní (Obr. 12, 13).

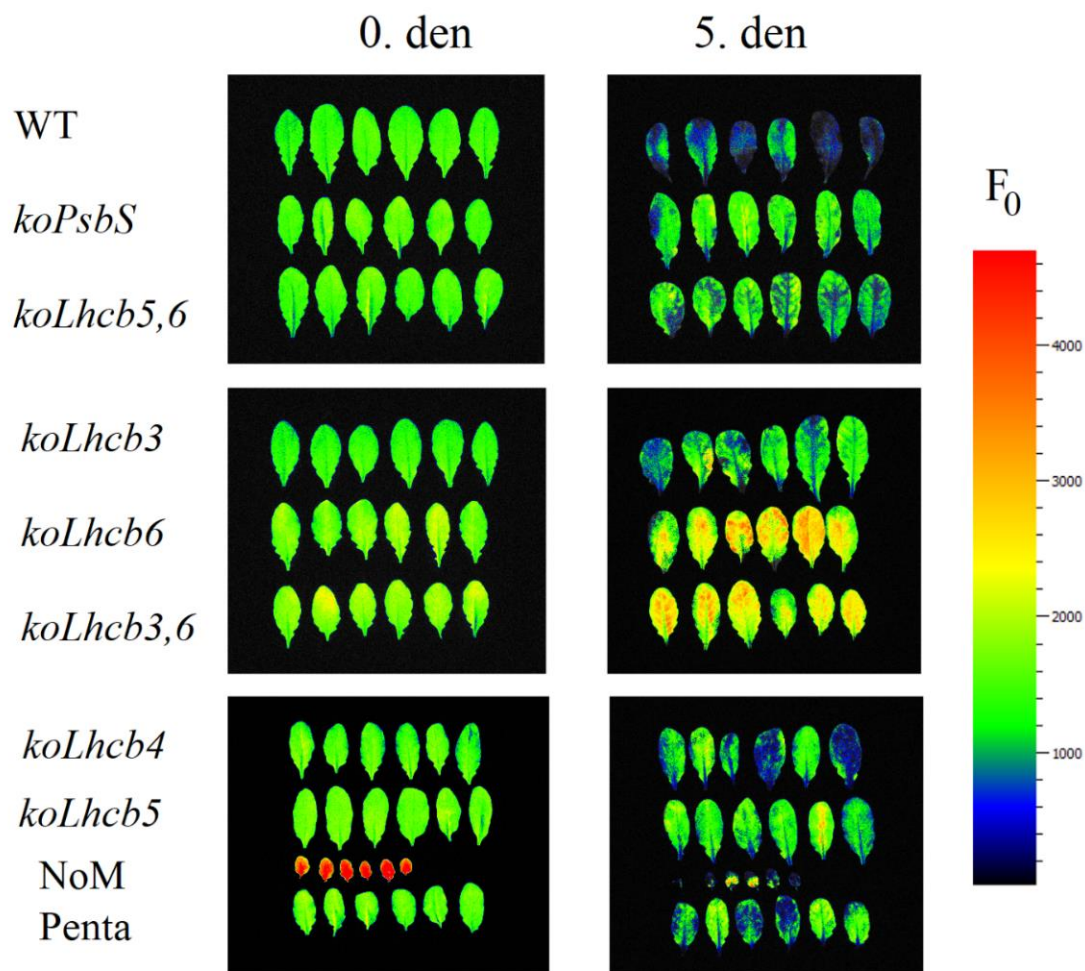


Obr. 12: Zobrazení parametru  $F_v/F_M$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě.

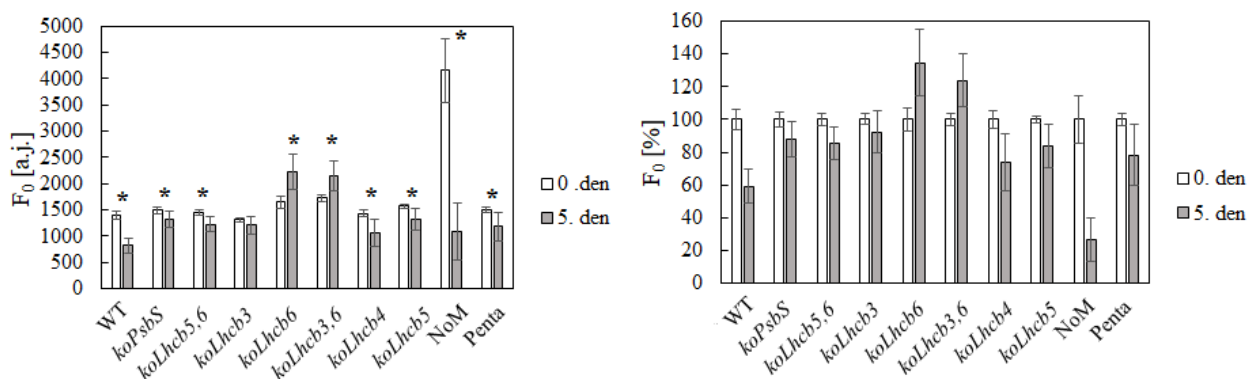


Obr. 13: Naměřené a relativní hodnoty (v %) parametru  $F_v/F_M$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den, relativní hodnoty = 100 %) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ . Hvězdičky (\*) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u čerstvě oddělených listů (0. den); hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .

Minimální intenzita fluorescence  $F_0$  se u právě oddělených listů většiny genotypů pohybovala kolem hodnoty 1500. Mírně vyšší hodnoty byly zaznamenány u *koLhcb6* a *koLhcb3,6*, výrazně vyšší hodnoty (4200) pak u genotypu NoM. U genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* pak byly pozorovány zvýšené hodnoty tohoto parametru 5. den po inkubaci ve tmě (až o 30 %). U ostatních genotypů byly 5. den naměřeny ve srovnání s 0. dnem nižší hodnoty parametru  $F_0$ . Hodnoty  $F_0$  byly u jednotlivých listů inkubovaných 5 dnů ve tmě heterogenní (Obr. 14, 15).

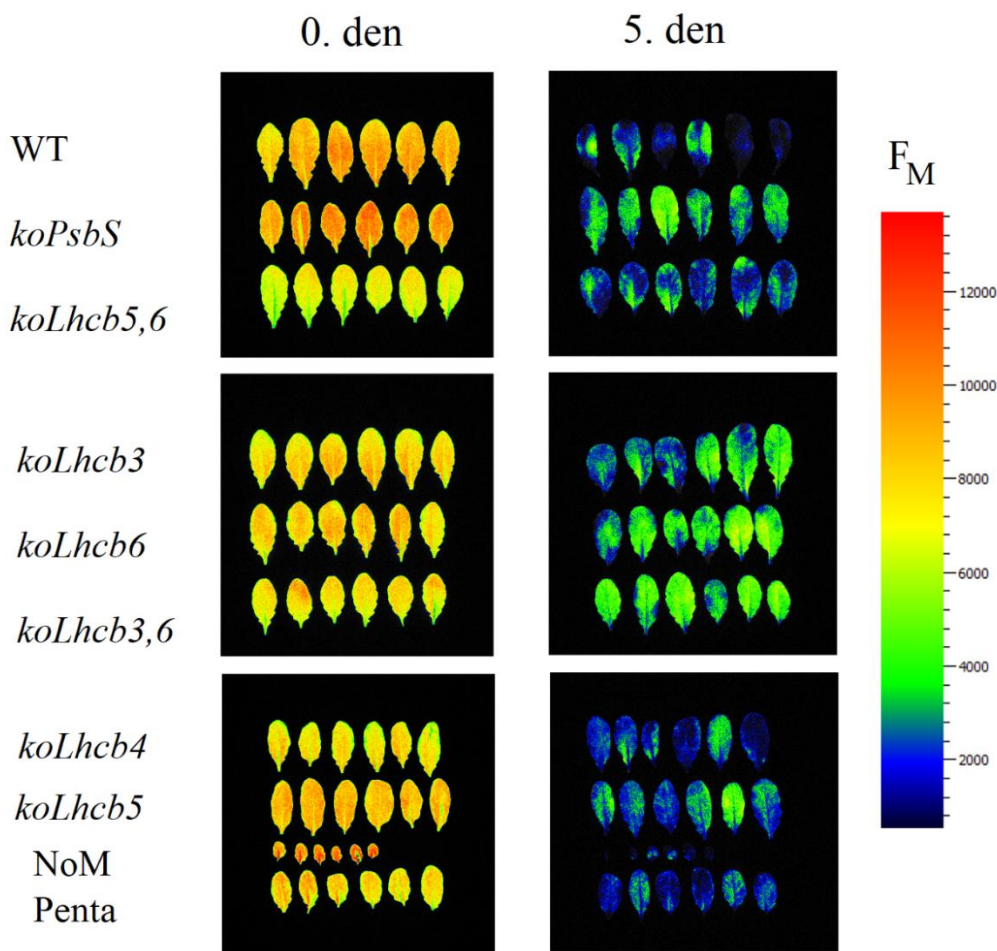


Obr. 14: Zobrazení parametru  $F_0$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě.

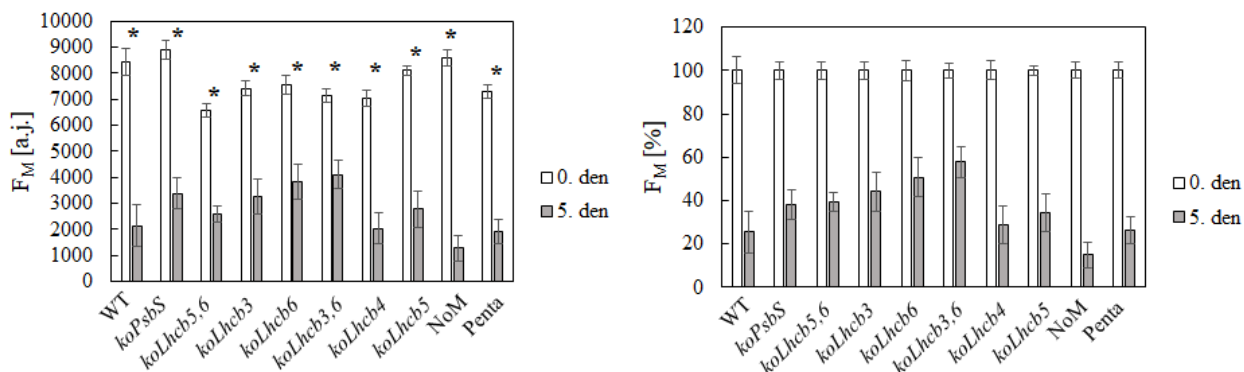


Obr. 15: Naměřené a relativní hodnoty (v %) parametru  $F_0$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den, relativní hodnoty = 100 %) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Hvězdičky (\*) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u čerstvě oddělených listů (0. den); hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .

Hodnoty parametru  $F_M$  (maximální intenzity chlorofylové fluorescence vzorku adaptovaného na tmu) byly 5. den (2000–4000) ve srovnání s 0. dnem (7000–9000) sníženy o 40 (*koLhcb3,6*) až 80 % (NoM). U parametru  $F_M$  nebyly 0. ani 5. den pozorovány žádné větší rozdíly mezi jednotlivými genotypy. Hodnoty  $F_M$  byly u jednotlivých listů inkubovaných 5 dnů ve tmě heterogenní (Obr. 16, 17).



Obr. 16: Zobrazení parametru  $F_M$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě.



Obr. 17: Naměřené a relativní hodnoty (v %) parametru  $F_M$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den, relativní hodnoty = 100 %) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ . Hvězdičky (\*) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u čerstvě oddělených listů (0. den); hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .

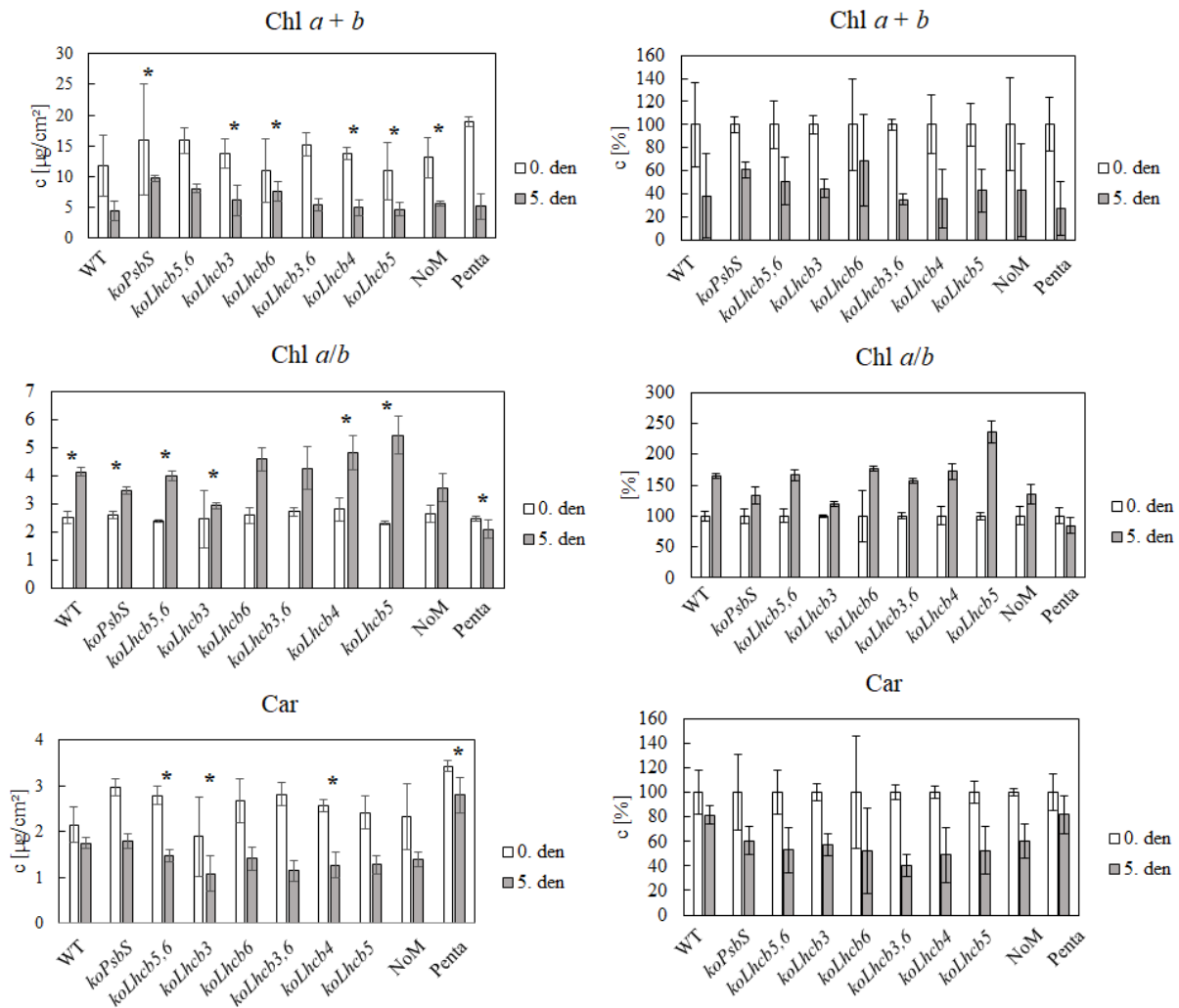
#### 4.1.1.2 Obsah fotosyntetických pigmentů

Pomocí spektrofotometrické analýzy byl u kontrolních oddělených listů (0. den) a listů, u kterých byla zatměním indukována senescence (5. den), stanoven součet obsahů chlorofylů  $a + b$ , poměr chlorofylů  $a/b$  a obsah karotenoidů (Obr. 18).

Hodnoty obsahu chlorofylu (chl  $a + b$ ) vztaženého na plochu listu se 0. den pohybovaly přibližně v rozmezí 11 až 19  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , nejvyšší obsah byl zjištěn u genotypu Penta. Pátý den došlo k poklesu a hodnoty se pohybovaly mezi 4 až 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , což představuje pokles o 30–70 %.

U hodnot poměru chlorofylů  $a/b$  nebyly 0. den pozorovány žádné větší rozdíly mezi jednotlivými genotypy. Pátý den nastalo zvýšení tohoto poměru u všech genotypů (u *koLhcb6*, *koLhcb3,6* a NoM statisticky nevýznamně) kromě genotypu Penta, k nejvyššímu nárůstu došlo u genotypů *koLhcb6*, *koLhcb4* a *koLhcb5*. Vyšší hodnoty u listů z 5. dne znamenají, že během inkubace ve tmě se rychleji degradoval chlorofyl  $b$ , a tedy i světlosběrné komplexy, než chlorofyl  $a$ , který se nachází i v reakčních centrech.

Při analýze obsahu karotenoidů byly 0. den zaznamenány hodnoty v rozmezí 2–3,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Nejvyšší obsah byl stejně jako v případě chlorofylu zjištěn u genotypu Penta. Pátý den došlo k poklesu obsahu karotenoidů přibližně o 20–60 %, přičemž nejvíce obsah karotenoidů klesl u *koLhcb3,6*.



Obr. 18: Absolutní obsah chlorofylů (Chl *a + b*), poměr mezi obsahy chlorofylů (Chl *a/b*), obsah karotenoidů (Car) a relativní obsah chlorofylů, poměr mezi obsahy chlorofylů, obsah karotenoidů (vyjádřené v %) naměřené v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den, relativní hodnoty = 100 %) a 5. den po oddělení a následně inkubaci ve tmě. Uvedeny průměry a SD,  $n = 3$ . Hvězdičky (\*) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u čerstvě oddělených listů (0. den); hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.1.3 Parametry $\Phi_P$ , NPQ a $1 - q_P$

Obrázky 19, 20 a 21 znázorňují průběhy parametrů  $\Phi_P$ , NPQ a  $1 - q_P$  naměřené u všech genotypů 0. a 5. den po inkubaci ve tmě.

Vzhledem k použití aktinického světla velmi vysoké intenzity během měření ( $1200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , tj. 12krát vyšší než pěstební světlo; použito z důvodu posouzení reakce mutantních genotypů na světlo vysoké intenzity), byly pozorovány relativně nízké hodnoty  $\Phi_P$  a relativně vysoké hodnoty NPQ i u kontrolních listů (0. den).

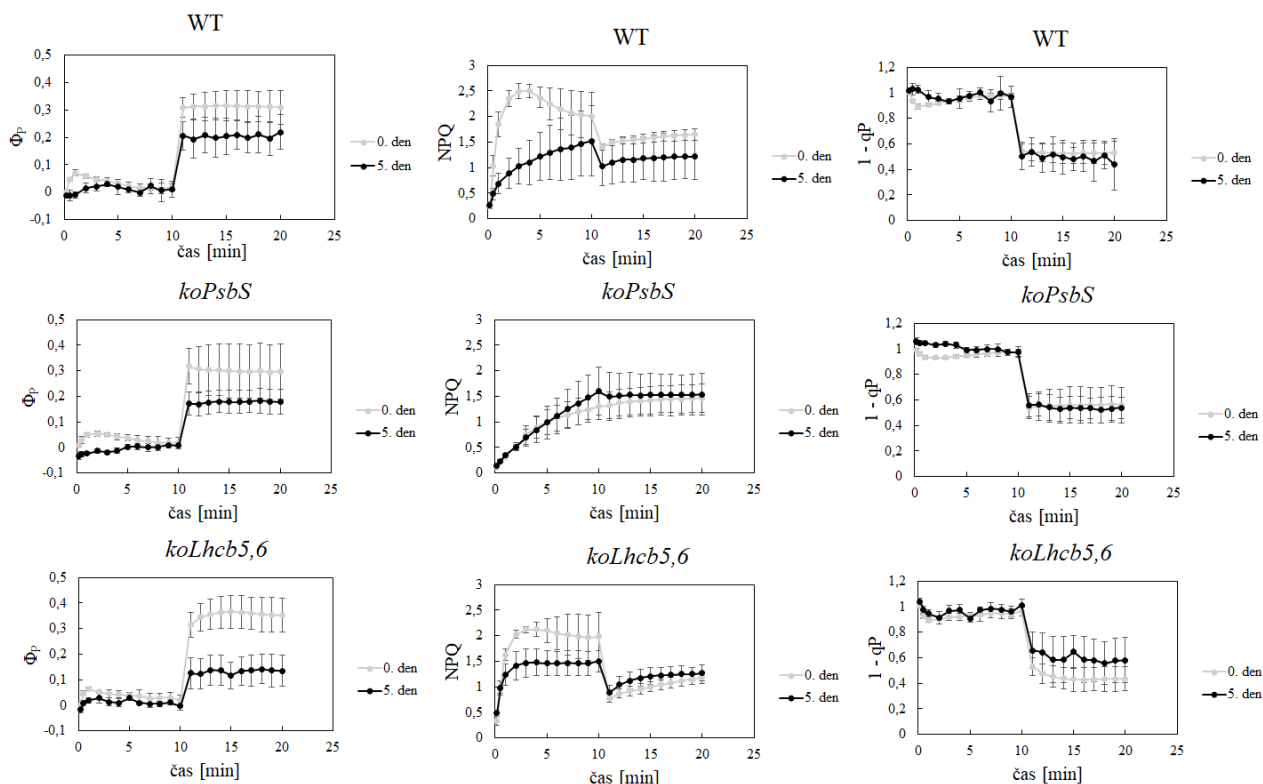
Hodnoty efektivního kvantového výtěžku fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na světlo ( $\Phi_P$ ) se při zapnutí aktinického světla pohybovaly 0. i 5. den okolo 0. Po vypnutí aktinického světla nastalo zvýšení hodnot, u listů z 0. dne k hodnotám mezi 0,2–0,3



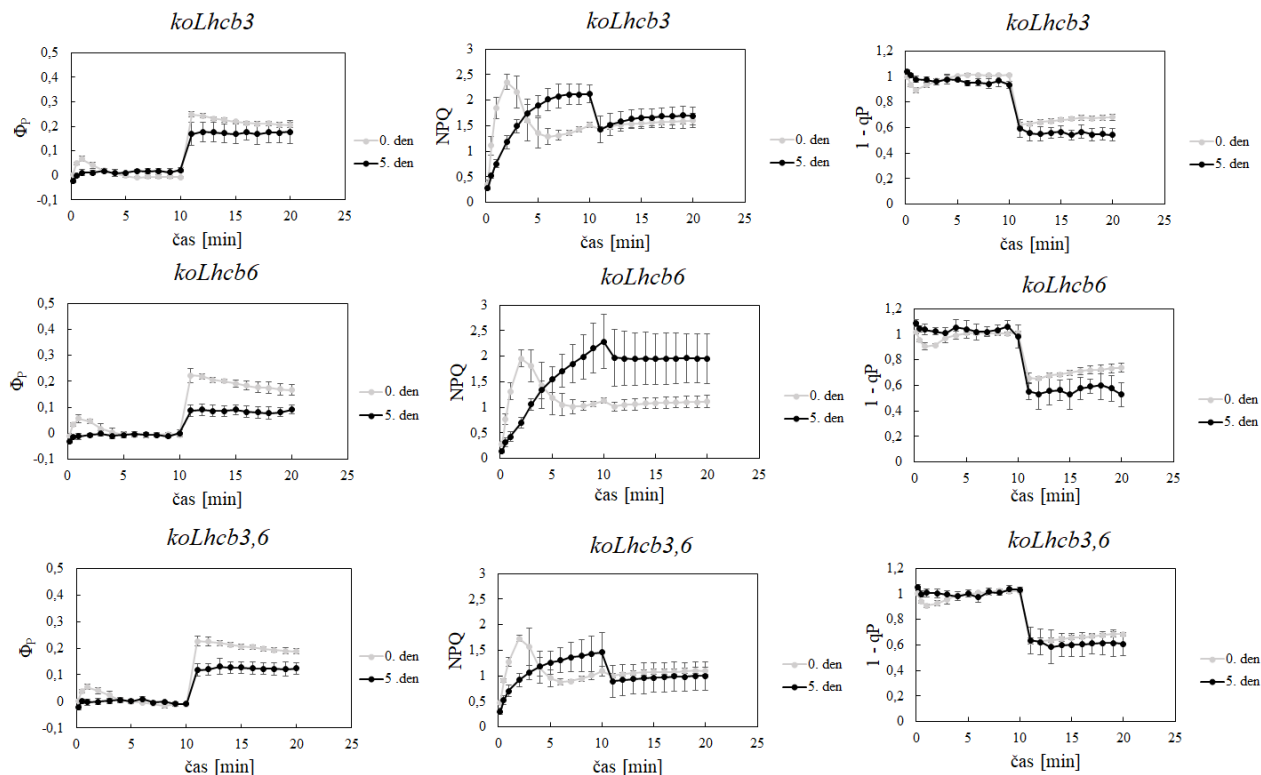
a u listů z 5. dne k hodnotám mezi 0,1–0,2. U genotypu NoM se i po vypnutí aktinického světla, a to 0. i 5. den, pohybovaly hodnoty okolo 0. U kontrolních listů byly nižší hodnoty  $\Phi_P$  ve tmě (kolem 0,2) zjištěny u *koLhcb3*, *koLhcb6*, *koLhcb3,6* a *koLhcb4*. Nízké hodnoty  $\Phi_P$  (obzvlášť po vypnutí aktinického světla) indikovaly výraznou inhibici fotochemie PSII. Pokud by PSII fungoval normálně, parametr  $\Phi_P$  by po vypnutí aktinického světla narůstal k hodnotám okolo 0,8.

Průběh nefotochemického zhášení (NPQ) během indukce a relaxace se u kontrolních listů různých genotypů lišil. Nárůst a mírný pokles během indukce a následný pokles po vypnutí aktinického světla byl zjištěn u WT, *koLhcb5,6*, *koLhcb5*, NoM a Penta. U genotypů *koLhcb3*, *koLhcb6*, *koLhcb3,6* a *koLhcb4* byl pokles NPQ během indukce rychlejší, zatímco pokles po vypnutí světla byl minimální ve srovnání s předchozími genotypy. Velmi pomalý nárůst NPQ bez poklesu jak během indukce, tak během relaxace ve tmě byl zjištěn u *koPsbS*. Maximální hodnoty NPQ se u kontrolních listů při zapnutém aktinickém světle pohybovaly okolo 2–2,5. Po vypnutí aktinického světla nastal pokles k hodnotám 0,5–1,5. Maximální hodnoty nefotochemického zhášení (NPQ) se u listů z 5. dne při zapnutém aktinickém světle pohybovaly okolo 1–2,5. Po vypnutí aktinického světla nastal pokles k hodnotám 1–2. Ve srovnání s 0. dnem, kdy docházelo zpočátku k rychlému nárůstu, a poté k prudšímu poklesu hodnot, vykazovaly průběhy tohoto parametru 5. den u většiny genotypů pomalý nárůst a po vypnutí aktinického světla pomalý pokles.

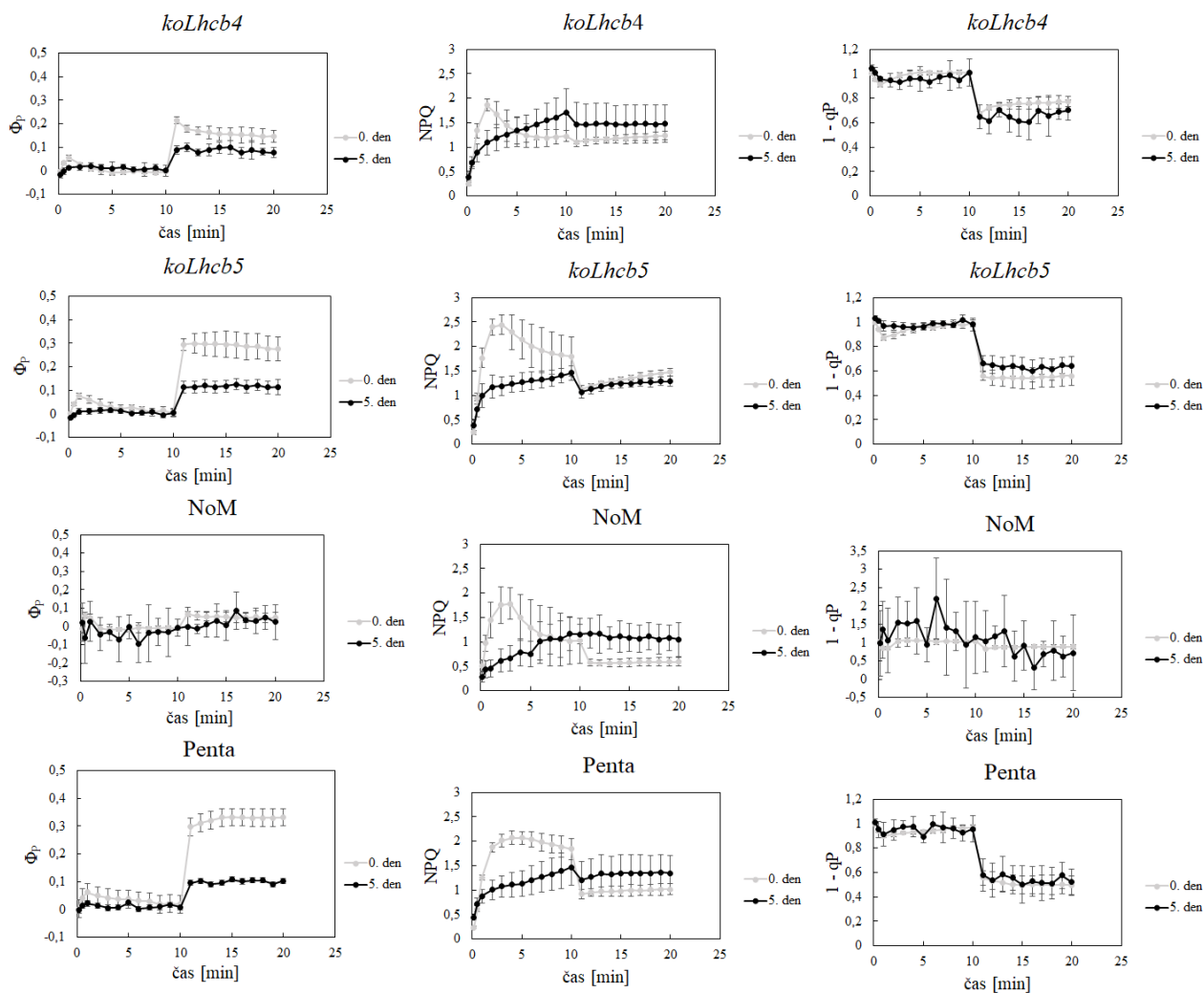
Hodnoty parametru  $1 - q_P$  se při zapnutém aktinickém světle pohybovaly u všech genotypů 0. i 5. den okolo 1, což odráží maximálně redukováný PQ pool v důsledku použití vysoké intenzity světla. Po vypnutí aktinického světla došlo k poklesu tohoto parametru na hodnoty okolo 0,6. Průběhy tohoto parametru u jednotlivých genotypů byly pro 0. i 5. den téměř totožné. Nebyly pozorovány větší rozdíly mezi genotypy navzájem. U genotypu NoM se hodnoty pohybovaly 0. i 5. den při zapnutém i vypnutém aktinickém světle okolo 1.



Obr. 19: Parametry  $\Phi_p$ , NPQ a  $1 - qP$  naměřené v oddělených listech genotypů WT, *koPsbS* a *koLhcb5,6* rostlin *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Prvních 10 minut bylo měřeno při aktinickém světle ( $1200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), následujících 10 minut po vypnutí aktinického světla. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .



Obr. 20: Parametry  $\Phi_p$ , NPQ a  $1 - qP$  naměřené v oddělených listech genotypů *koLhcb3*, *koLhcb6* a *koLhcb3,6* rostlin *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Prvních 10 minut bylo měřeno při aktinickém světle ( $1200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), následujících 10 minut po vypnutí aktinického světla. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .

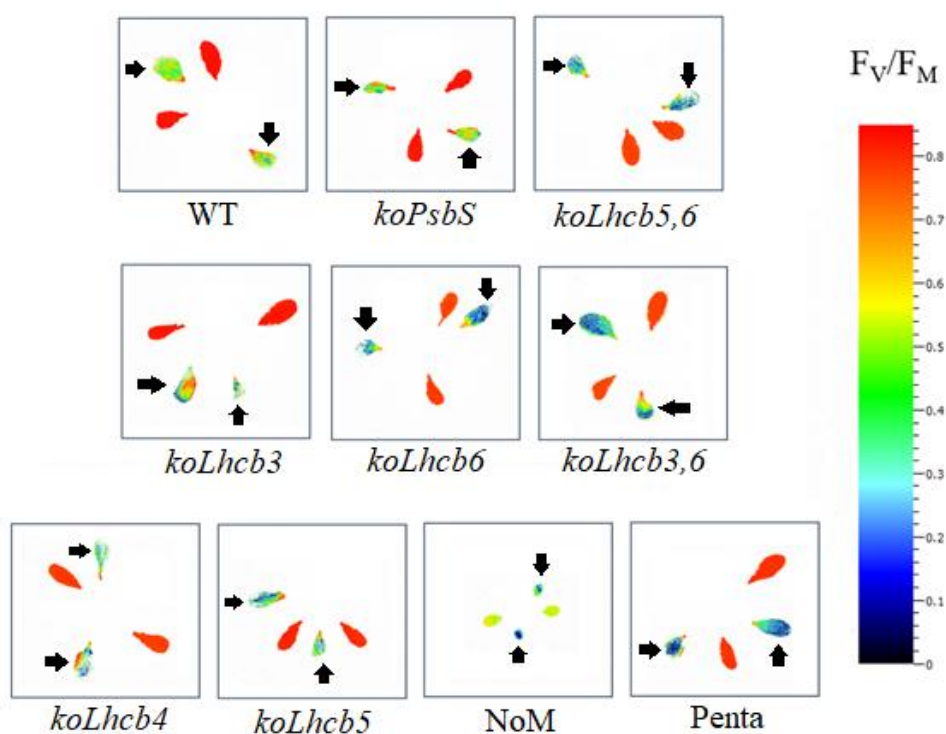


Obr. 21: Parametry  $\Phi_p$ , NPQ a  $1 - q_p$  naměřené v oddělených listech genotypů *koLhcb4*, *koLhcb5*, NoM a Penta rostlin *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Prvních 10 minut bylo měřeno při aktinickém světle ( $1200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), následujících 10 minut po vypnutí aktinického světla. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .

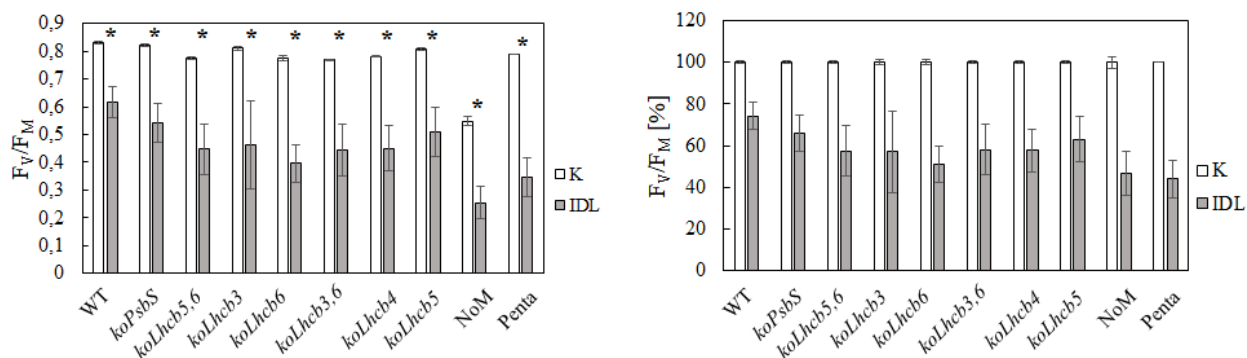
## 4.1.2 Individuálně zatemněné listy (IDL)

### 4.1.2.1 Obrazové záznamy parametrů $F_V/F_M$ , $F_0$ a $F_M$

Parametr  $F_V/F_M$  se u kontrolních nezatemněných listů všech genotypů, s výjimkou genotypu NoM, pohyboval okolo hodnoty 0,8. U genotypu NoM byl 0. den parametr  $F_V/F_M$  snížen na hodnotu 0,55. U zatemněných listů (IDL) došlo k poklesu parametru  $F_V/F_M$  u všech genotypů na hodnoty mezi 0,25–0,6. Nejvyšší pokles byl pozorován u genotypů *koLhcb6*, *koLhcb3,6*, NoM, *koLhcb5,6* a Penta (ve srovnání s kontrolou snížení o 50–55 %). Naopak nejnižší pokles hodnot tohoto parametru byl zaznamenán u genotypů WT, *koPsbS* a *koLhcb3*. Hodnoty  $F_V/F_M$  byly u jednotlivých listů inkubovaných 5 dnů ve tmě heterogenní (Obr. 22, 23).

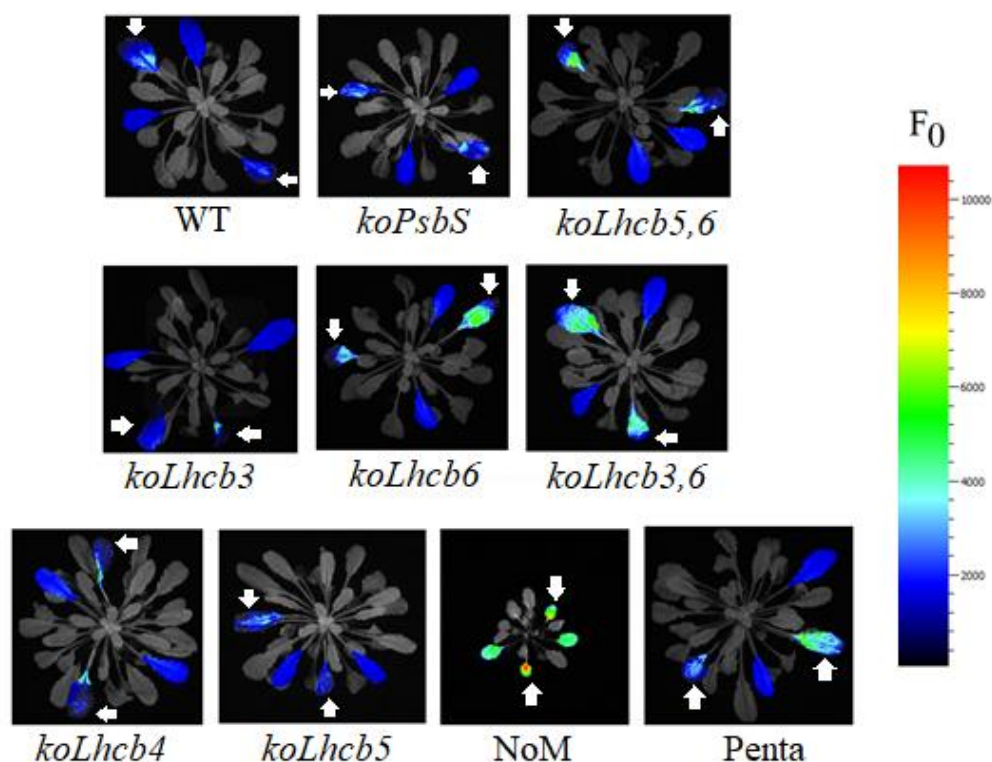


Obr. 22: Zobrazení parametru  $F_V/F_M$  v nezatemněných a zatemněných (IDL) listech vybraných rostlin 10 genotypů *A. thaliana* L. 5. den po zatemnění. Černé šipky označují IDL, neoznačené listy jsou kontrolní.

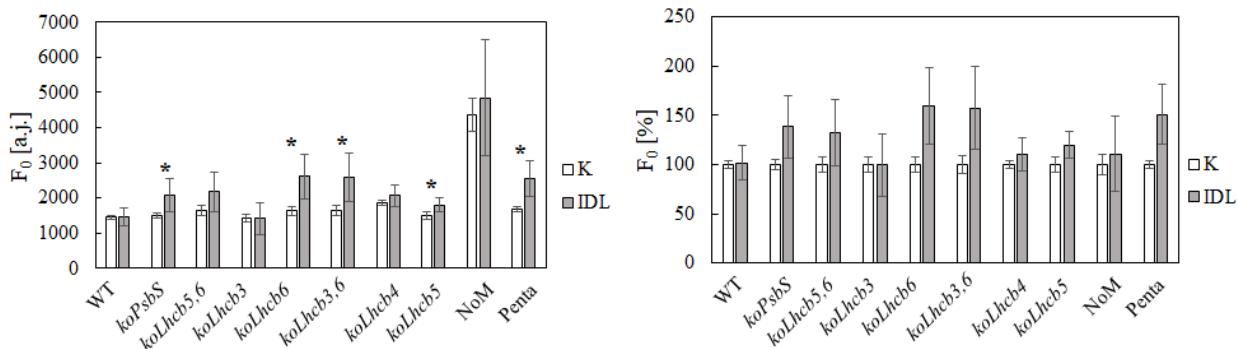


Obr. 23: Naměřené a relativní hodnoty (v %) parametru  $F_v/F_M$  v nezatemněných (K, relativní hodnoty = 100 %) a zatemněných (IDL) listech 10 genotypů *A. thaliana* L. 5. den po zatemnění. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ . Hvězdičky (\*) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u kontrolních listů; hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .

Parametr  $F_0$  se u kontrolních listů většiny genotypů pohyboval okolo hodnoty 1500, u genotypu NoM byla naměřena hodnota 4200. U IDL došlo ve srovnání s kontrolou k nárůstu hodnot u většiny genotypů (kromě *koLhcb3*) až o 60 %. K nejvyššímu nárůstu hodnot došlo u genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6*. Hodnoty  $F_0$  byly u jednotlivých listů inkubovaných 5 dnů ve tmě heterogenní (Obr. 24, 25).

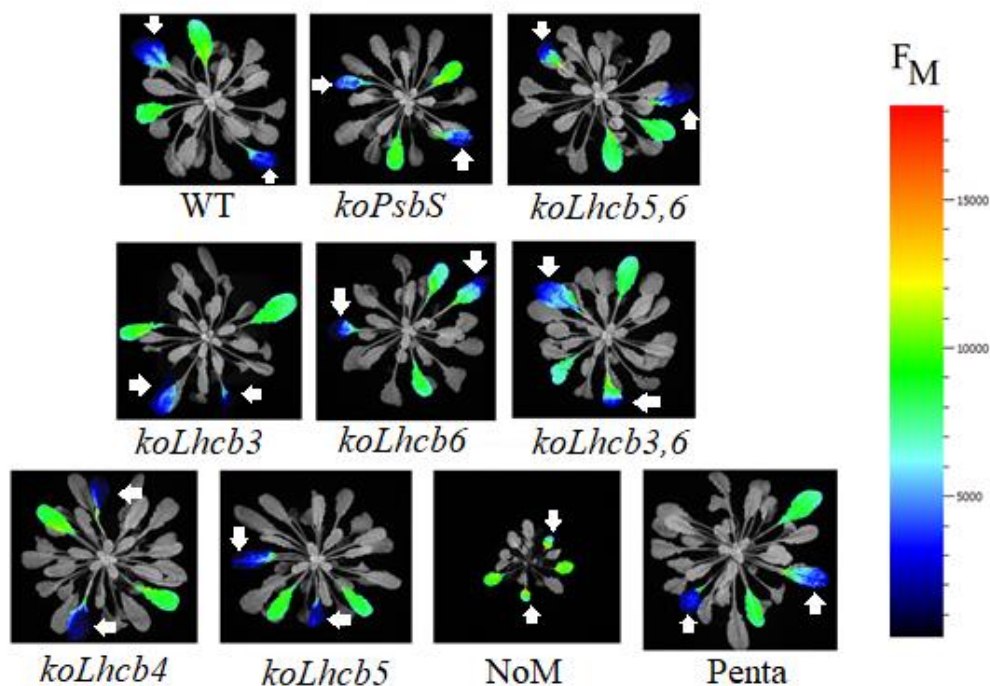


Obr. 24: Zobrazení parametru  $F_0$  v nezatemněných a zatemněných (IDL) listech vybraných rostlin 10 genotypů *A. thaliana* L. 5. den po zatemnění. Bílé šípky označují IDL, neoznačené listy jsou kontrolní.

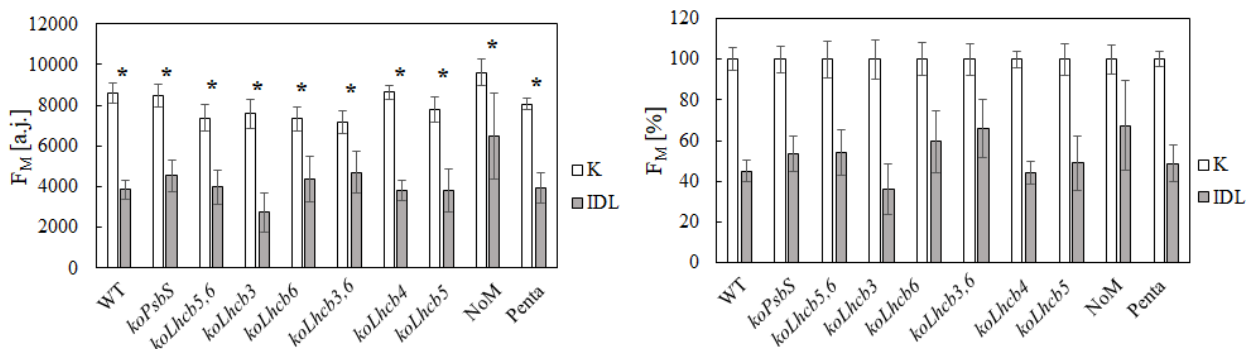


Obr. 25: Naměřené a relativní hodnoty (v %) parametru  $F_0$  v nezatemněných (K, relativní hodnoty = 100 %) a zatemněných (IDL) listech 10 genotypů *A. thaliana* L. 5. den po zatemnění. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ . Hvězdičky (\*) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u kontrolních listů; hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .

Hodnoty parametru  $F_M$  byly u IDL (3000–6000) ve srovnání s kontrolními listy (7000–9000) sníženy o 35–60 %. U parametru  $F_M$  nebyly u IDL ani kontrolních listů pozorovány žádné větší rozdíly mezi jednotlivými genotypy. Hodnoty  $F_M$  byly u jednotlivých listů inkubovaných 5 dnů ve tmě heterogenní (Obr. 26, 27).



Obr. 26: Zobrazení parametru  $F_M$  v nezatemněných a zatemněných (IDL) listech vybraných rostlin 10 genotypů *A. thaliana* L. 5. den po zatemnění. Bílé šipky označují IDL, neoznačené listy jsou kontrolní.



Obr. 27: Naměřené a relativní hodnoty (v %) parametru  $F_M$  v nezatemněných (K, relativní hodnoty = 100 %) a zatemněných (IDL) listech 10 genotypů *A. thaliana* L. 5. den po zatemnění. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ . Hvězdičky (\*) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u kontrolních listů; hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .

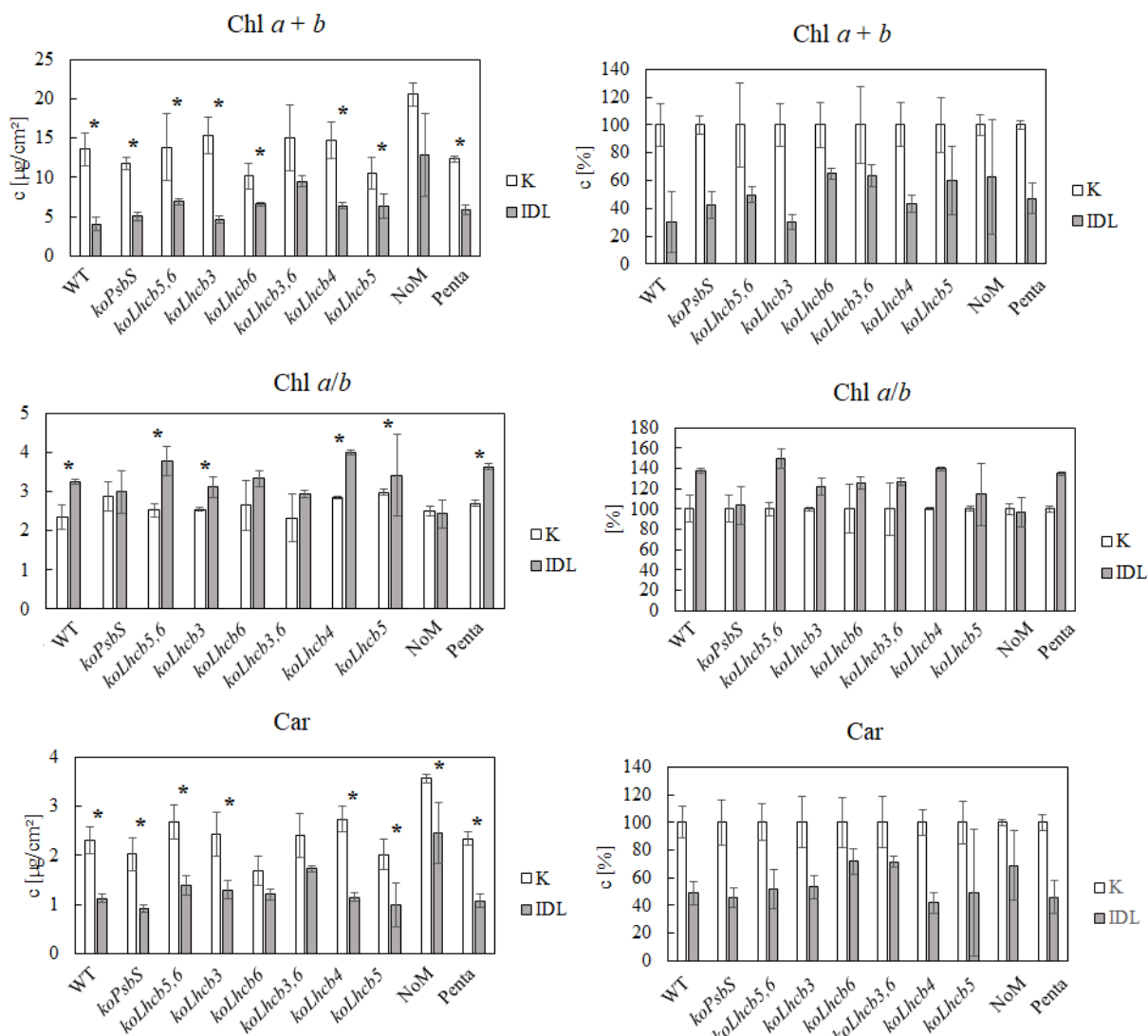
#### 4.1.2.2 Obsah fotosyntetických pigmentů

Pomocí spektrofotometrické analýzy byl u kontrolních listů a zatemněných listů (IDL), stanoven součet obsahů chlorofylů *a* a *b*, poměr chlorofylů *a/b* a obsah karotenoidů (Obr. 28).

Hodnoty obsahu chlorofylu (chl *a* + *b*) vztaženého na plochu listu se u kontrolních listů pohybovaly přibližně v rozmezí 10 až 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . U IDL došlo k poklesu a hodnoty se pohybovaly mezi 4 až 12  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , byl tedy pozorován pokles o 30–70 %.

U hodnot poměru chlorofylů *a/b* nebyly u kontrolních listů pozorovány žádné větší rozdíly mezi jednotlivými genotypy. U IDL nastalo zvýšení tohoto poměru u všech genotypů (u *koPsbS*, *koLhcb6* a *koLhcb3,6* statisticky nevýznamně) s výjimkou genotypu NoM. K nejvyššímu nárůstu došlo u genotypů *koLhcb5,6* a *koLhcb4*. Vyšší hodnoty u listů z 5. dne znamenají, že během inkubace ve tmě se rychleji degradoval chlorofyl *b*, a tedy i světlosběrné komplexy, než chlorofyl *a*, který se nachází i v reakčních centrech.

Při analýze obsahu karotenoidů byly u kontrolních listů zaznamenány hodnoty v rozmezí 1,5–3,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . U IDL došlo k poklesu obsahu karotenoidů přibližně o 30–60 %, nejméně u *koLhcb6* a *koLhcb3,6*, nejvíce u *koLhcb4*.



Obr. 28: Absolutní obsah chlorofylů (Chl *a + b*), poměr mezi obsahy chlorofylů (Chl *a/b*), obsah karotenoidů (Car) a relativní obsah chlorofylů, poměr mezi obsahy chlorofylů, obsah karotenoidů (vyjádřené v %) naměřené v nezatemněných (K, relativní hodnoty = 100 %) a zatemněných (IDL) listech 10 genotypů *A. thaliana* L. 5. den po zatemnění. Uvedeny průměry a SD,  $n = 3$ . Hvězdičky (\*) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u kontrolních listů; hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.2.3 Parametry $\Phi_P$ , NPQ a 1 - qP

Obrázky 29, 30 a 31 znázorňují průběhy parametrů  $\Phi_P$ , NPQ a 1 - qP naměřené u kontrolních listů a IDL všech genotypů.

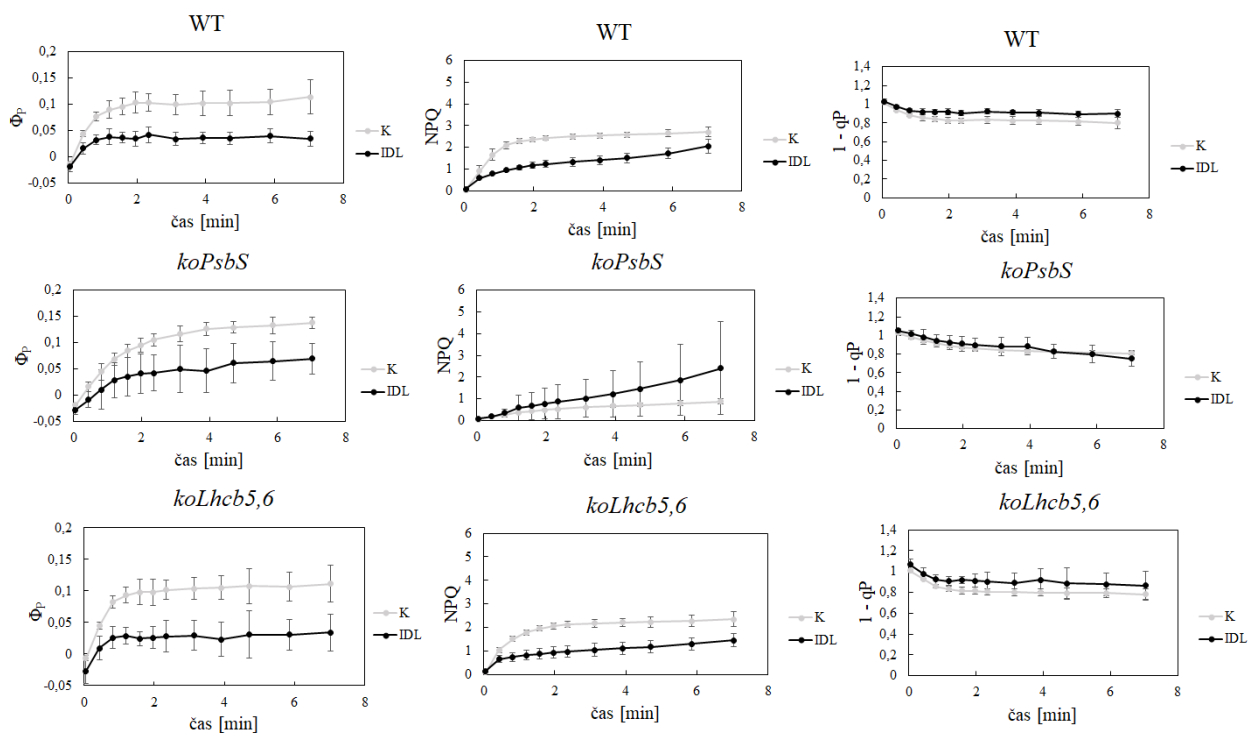
Vzhledem k použití aktinického světla velmi vysoké intenzity během měření ( $1200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , tj. 12krát vyšší než pěstební světlo), byly pozorovány relativně nízké hodnoty  $\Phi_P$  a relativně vysoké hodnoty NPQ i u kontrolních listů.

Hodnoty parametru  $\Phi_P$  se při zapnutí aktinického světla pohybovaly u kontroly okolo 0,1–0,13 a u IDL okolo 0,02–0,05. V zatemněných listech tedy došlo k poklesu fotochemie PSII.

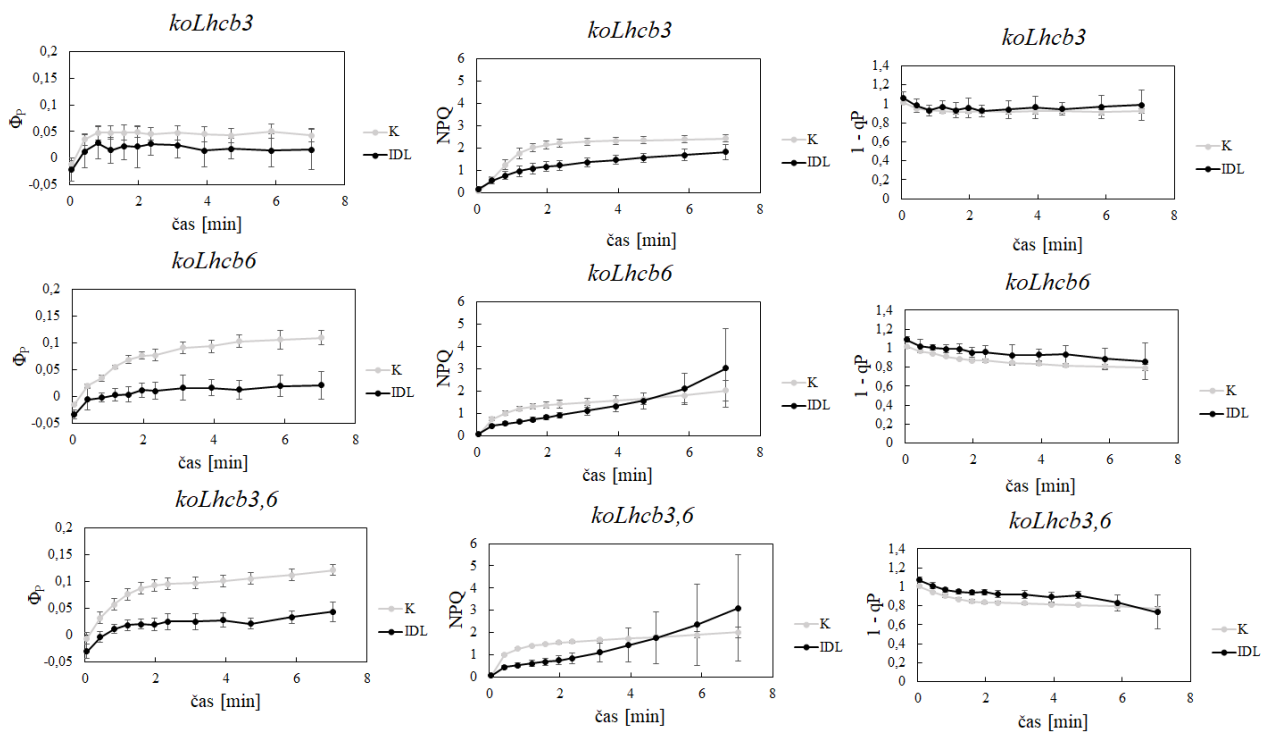


Maximální hodnoty NPQ se u kontrolních listů při zapnutém aktinickém světle pohybovaly okolo 2–2,5. Maximální hodnoty NPQ se u IDL při zapnutém aktinickém světle pohybovaly okolo 1–3. Ve srovnání s kontrolou, kdy docházelo zpočátku k rychlému nárůstu, vykazovaly průběhy tohoto parametru u IDL většiny genotypů pomalejší nárůst.

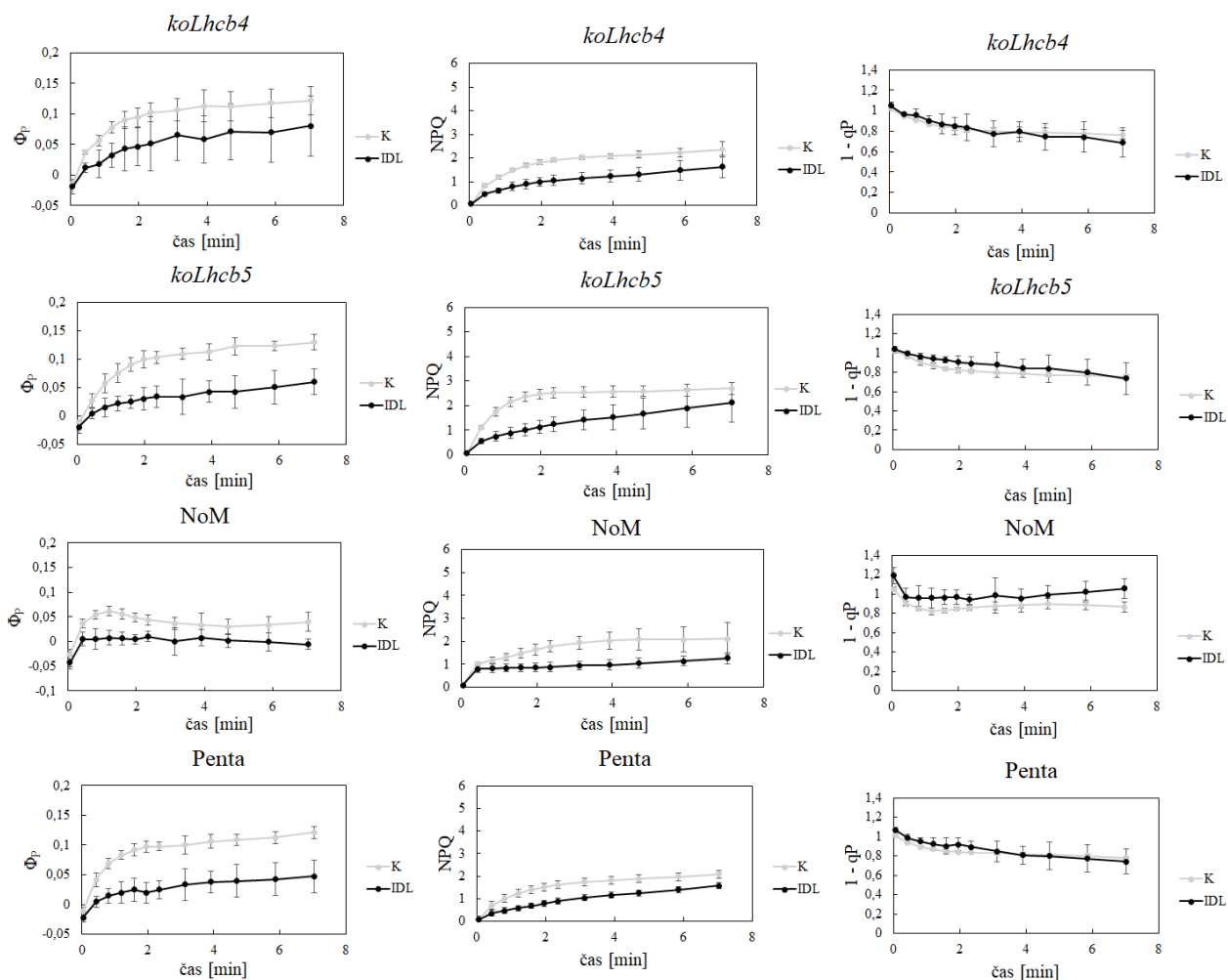
Hodnoty parametru  $1 - qP$  se při zapnutém aktinickém světle pohybovaly u kontrol i IDL většiny genotypů okolo 0,8, u IDL genotypu NoM okolo 1. Průběhy tohoto parametru u jednotlivých genotypů byly pro kontroly i IDL téměř totožné. Nebyly pozorovány větší rozdíly mezi genotypy navzájem (kromě IDL genotypu NoM).



Obr. 29: Parametry  $\Phi_P$ , NPQ a  $1 - qP$  naměřené v nezatemněných (K) a zatemněných (IDL) listech genotypů WT, *koPsbS*, *koLhcb5,6* *A. thaliana* L. 5. den po zatemnění. Byla použita zkrácená procedura, kdy bylo přibližně 7 minut zapnuto aktinické světlo o intenzitě  $1200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .



Obr. 30: Parametry  $\Phi_P$ , NPQ a  $1 - qP$  naměřené v nezatemněných (K) a zatemněných (IDL) listech genotypů *koLhcb3*, *koLhcb6*, *koLhcb3,6* *A. thaliana* L. 5. den po zatemnění. Byla použita zkrácená procedura, kdy bylo přibližně 7 minut zapnuto aktinické světlo o intenzitě  $1200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .



Obr. 31: Parametry  $\Phi_p$ , NPQ a  $1 - qP$  naměřené v nezatemněných (K) a zatemněných (IDL) listech genotypů *koLhcb4*, *koLhcb5*, NoM a Penta *A. thaliana* L. 5. den po zatemnění. Byla použita zkrácená procedura, kdy bylo přibližně 7 minut zapnuto aktinické světlo o intenzitě  $1200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .

## 4.2 Experiment 2

V rámci experimentu 2 bylo provedeno analytické stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů a měření parametrů chlorofylové fluorescence u oddělených listů 10 genotypů rostliny *A. thaliana* L., a to bezprostředně (0. den), 5. den po oddělení a následné inkubaci na kontinuálním světle (intenzita  $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Při měření chlorofylové fluorescence pomocí přístroje FluorCam byly sledovány parametry  $F_v/F_m$ ,  $F_0$ ,  $F_m$ ,  $\Phi_p$ , NPQ a  $1 - qP$  a bylo použito aktinické světlo o intenzitě  $200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

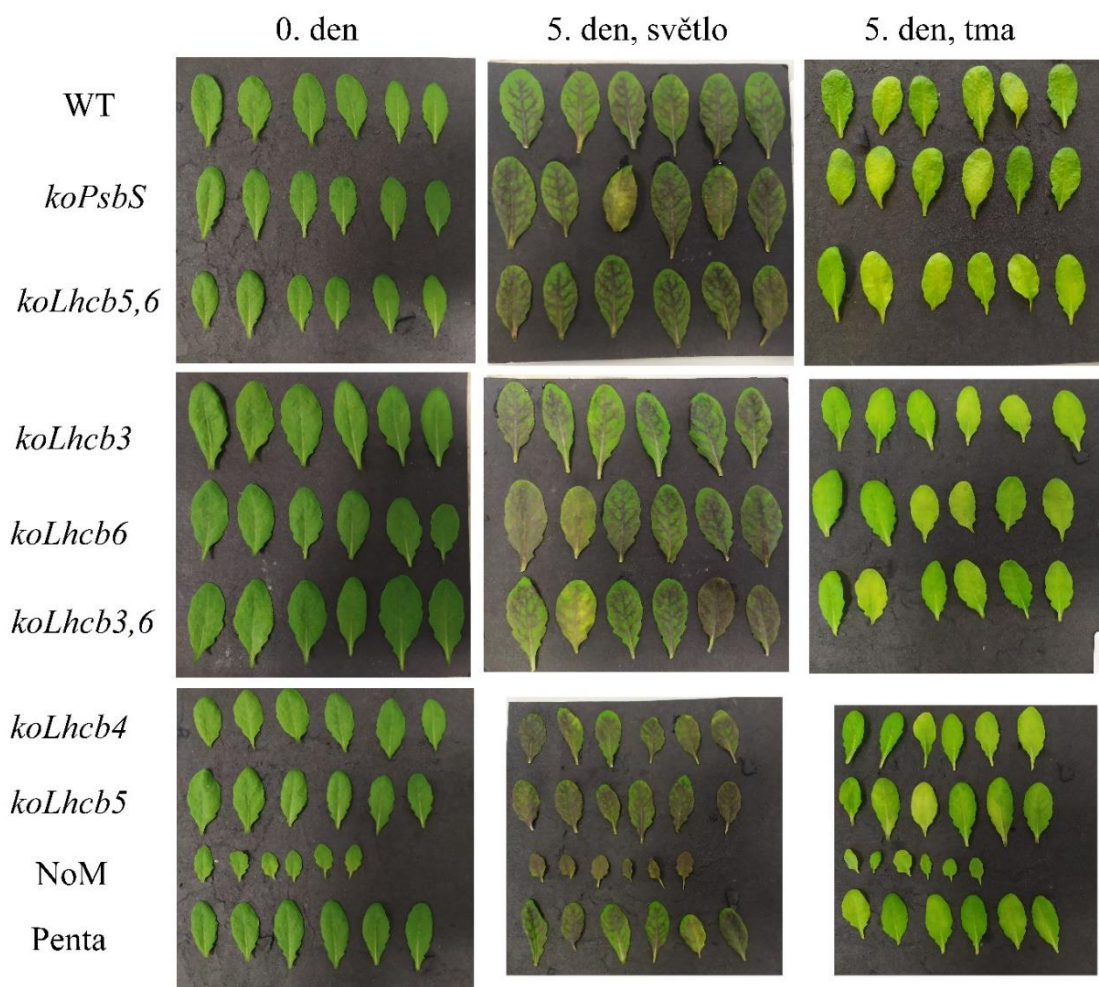
#### 4.2.1 Obrazové záznamy parametrů $F_v/F_M$ , $F_0$ a $F_M$

Oddělené listy byly vždy po změření parametrů chlorofylové fluorescence na přístroji FluorCam vyfotografovány (Obr. 32).

Čerstvě oddělené listy (z 0. dne) byly výrazně zelené. Listy genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* byly v porovnání s WT mírně menší. Listy genotypu NoM byly v porovnání s ostatními genotypy výrazně menší. Tyto morfologické odchylky (zmenšení listů) mohou již předem indikovat funkční změny.

U listů inkubovaných 5 dnů na kontinuálním světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) byla pozorována kumulace antokyanů, zejména v oblasti žilek. Listy všech genotypů byly ve srovnání s listy z 0. dne mírně větší.

Listy inkubované 5 dnů ve tmě zežloutly, což indikuje spuštění procesu senescence. Vizually nebyly mezi jednotlivými genotypy pozorovány žádné větší rozdíly ve žlutosti listů.

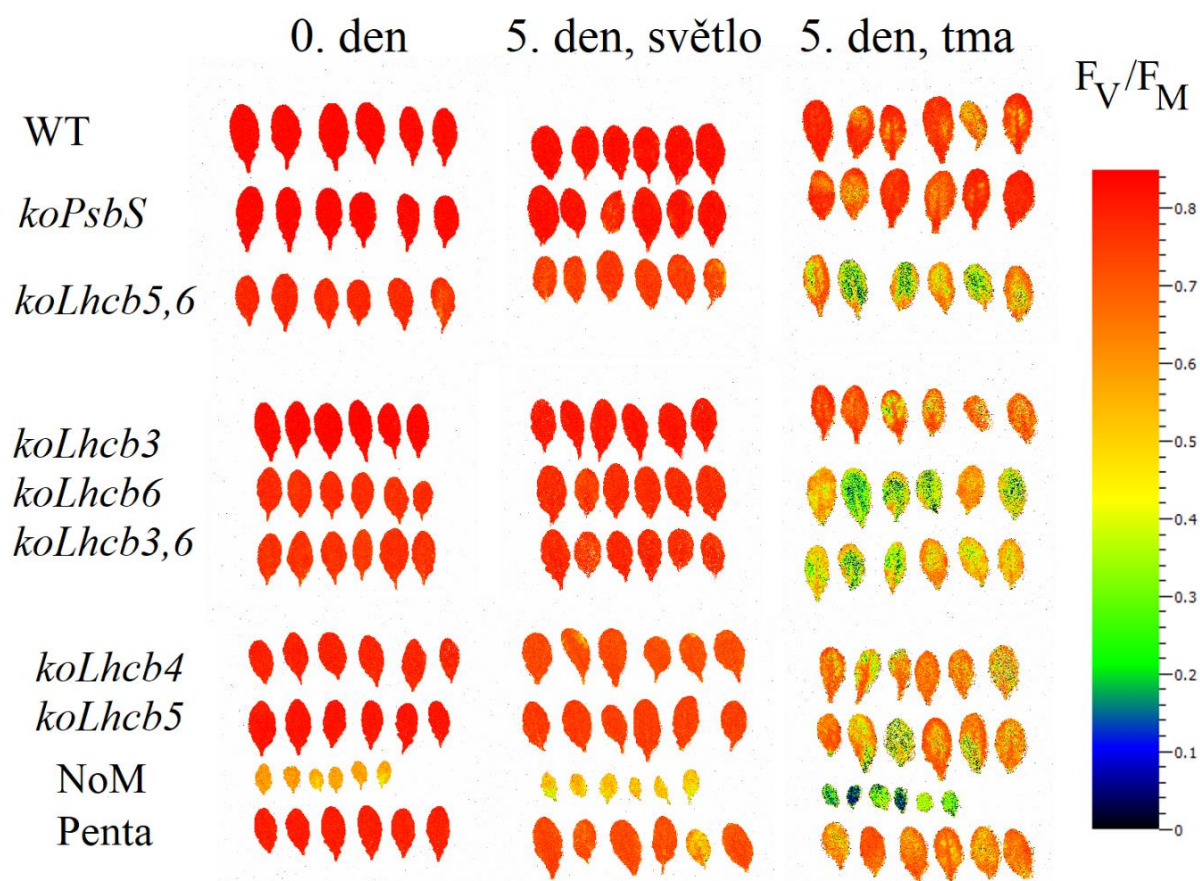


Obr. 32: Fotografie oddělených listů 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den), 5. den po oddělení a následné inkubaci na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě.

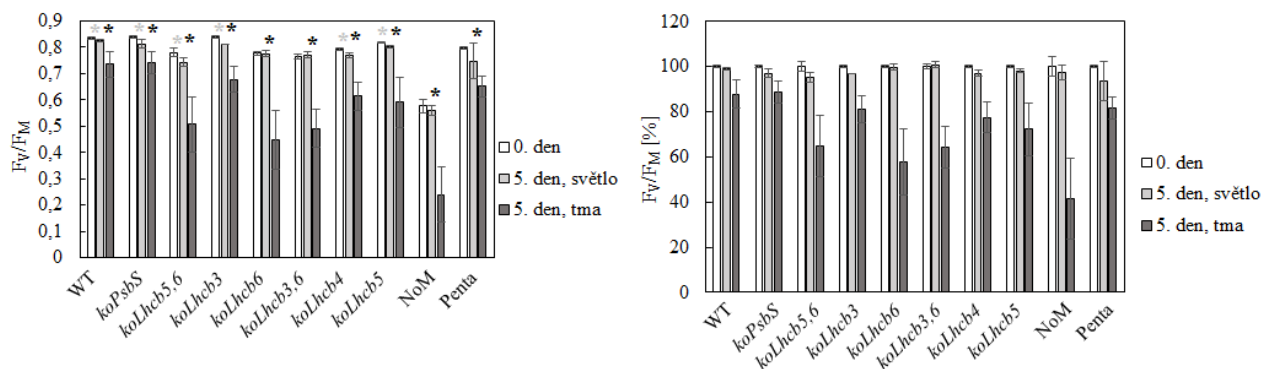
Parametr  $F_V/F_M$  se u kontrolních listů všech genotypů (0. den), s výjimkou genotypu NoM, pohyboval okolo hodnoty 0,8. U genotypu NoM byl parametr  $F_V/F_M$  ve srovnání s ostatními genotypy snížena na hodnotu 0,6 (snížení asi o 25 % ve srovnání s ostatními genotypy). Mírně nižší hodnoty  $F_V/F_M$  byly zjištěny u genotypů *koLhcb5,6*, *koLhcb6* a *koLhcb3,6*.

Po inkubaci oddělených listů 5 dnů na kontinuálním světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) se parametr  $F_V/F_M$  stejně jako u kontrolních listů pohyboval u všech genotypů okolo hodnoty 0,8. U genotypu NoM byl parametr  $F_V/F_M$  ve srovnání s ostatními genotypy taktéž snížena na hodnotu 0,6.

Po inkubaci oddělených listů 5 dnů ve tmě došlo k poklesu parametru  $F_V/F_M$  u všech genotypů na hodnoty 0,2–0,7. Nejvyšší pokles byl pozorován u genotypů *koLhcb6*, *koLhcb3,6*, *koLhcb5,6* a NoM (ve srovnání s kontrolou snížení o 40–60 %). Naopak nejnižší pokles hodnot tohoto parametru byl zaznamenán u genotypů WT, *koPsbS*, *koLhcb3* a Penta. Hodnoty  $F_V/F_M$  byly u jednotlivých listů inkubovaných 5 dnů ve tmě heterogenní (Obr. 33, 34).

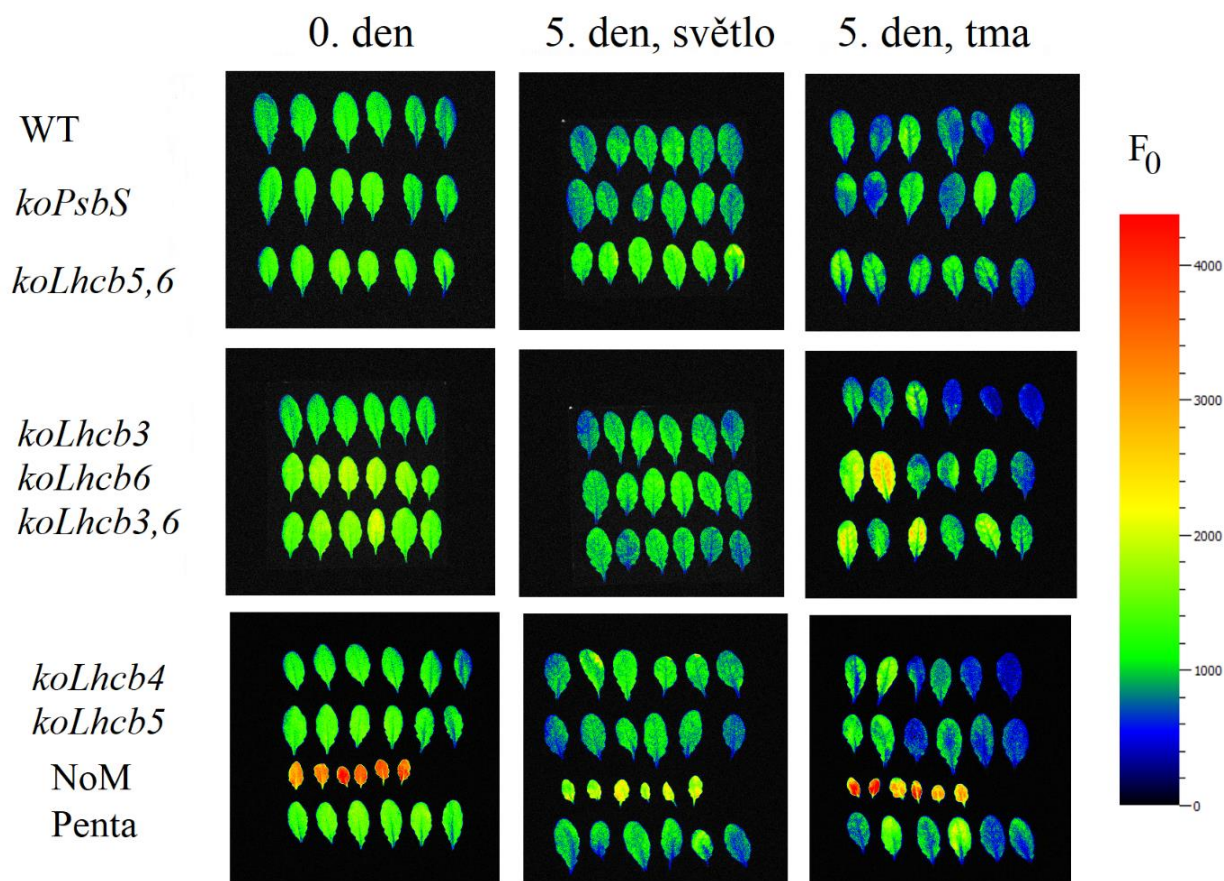


Obr. 33: Zobrazení parametru  $F_V/F_M$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den), 5. den po oddělení a následné inkubaci na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě.

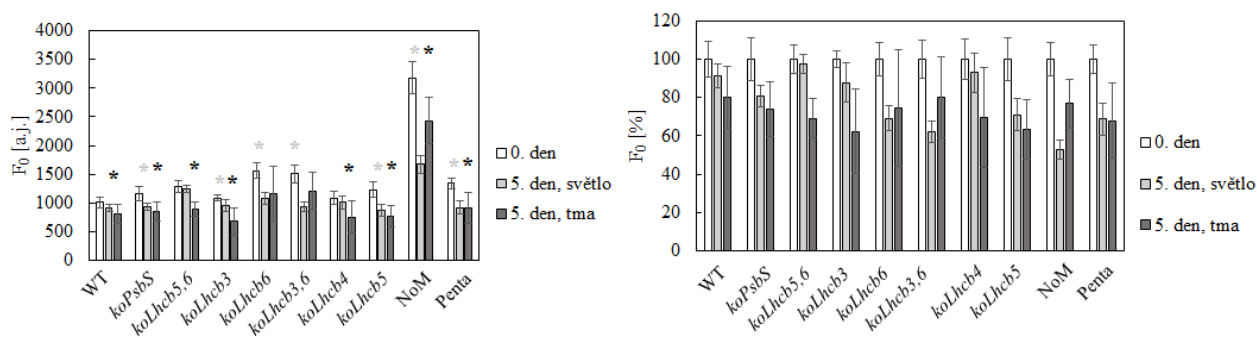


Obr. 34: Naměřené a relativní hodnoty (v %) parametru  $F_v/F_M$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den, relativní hodnoty = 100 %), 5. den po oddělení a následné inkubaci na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ . Hvězdičky (\*; šedá při srovnávání kontroly a listů inkubovaných na světle, černá při srovnávání kontroly a listů inkubovaných ve tmě) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u čerstvě oddělených listů (0. den); hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .

Parametr  $F_0$  se 0. den u většiny genotypů pohyboval v rozmezí hodnot 1000–1500, u genotypu NoM byla naměřena hodnota 3200. Pátý den došlo u listů inkubovaných na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ve srovnání s kontrolou k mírnému poklesu na hodnotu okolo 1000 (pokles o 0–50 %). Pátý den došlo u listů inkubovaných ve tmě ve srovnání s 0. dnem k poklesu na hodnoty v rozmezí 700–900 (pokles o 20–40 %). U listů genotypů *koLhcb6*, *koLhcb3,6* a NoM inkubovaných 5 dnů ve tmě nastalo ve srovnání s listy inkubovanými na světle k nárůstu hodnot, a to až o 30 %. Hodnoty  $F_0$  byly u jednotlivých listů inkubovaných 5 dnů ve tmě heterogenní (Obr. 35, 36).

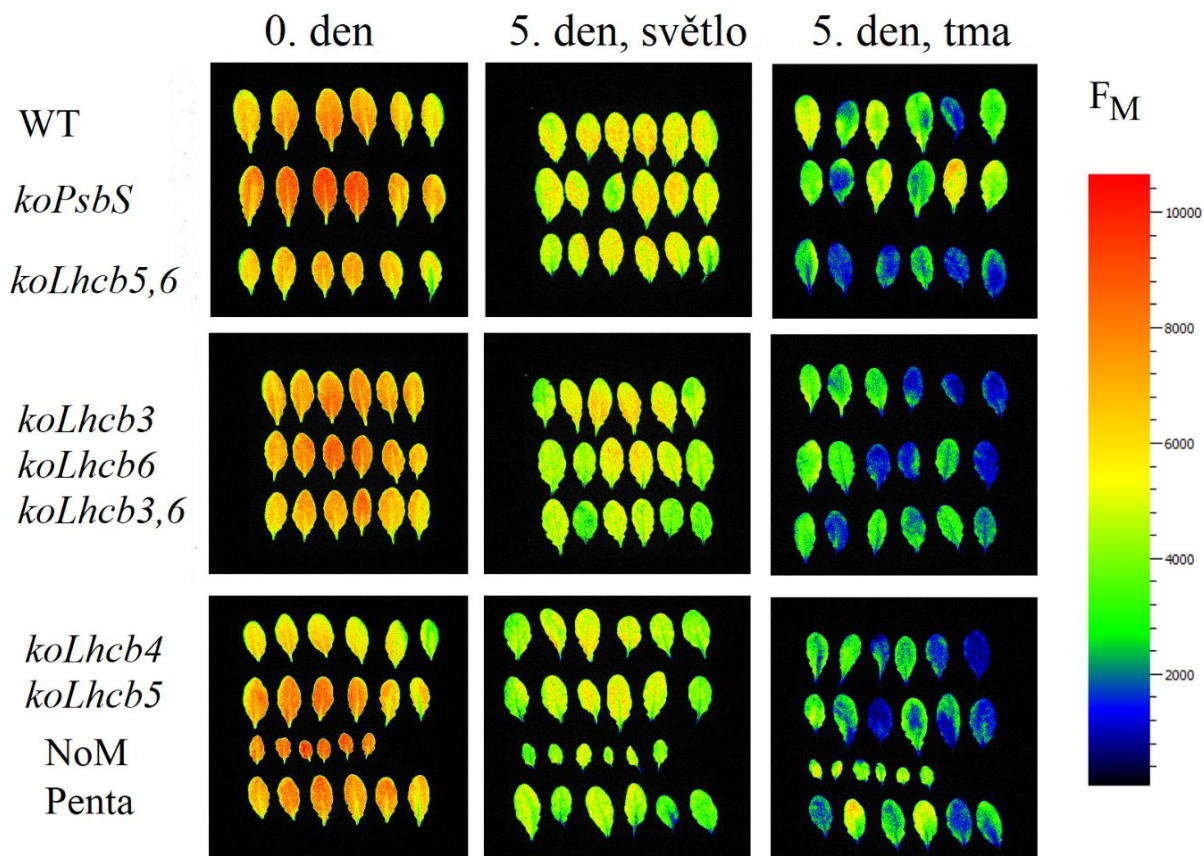


Obr. 35: Zobrazení parametru  $F_0$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den), 5. den po oddělení a následné inkubaci na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě.

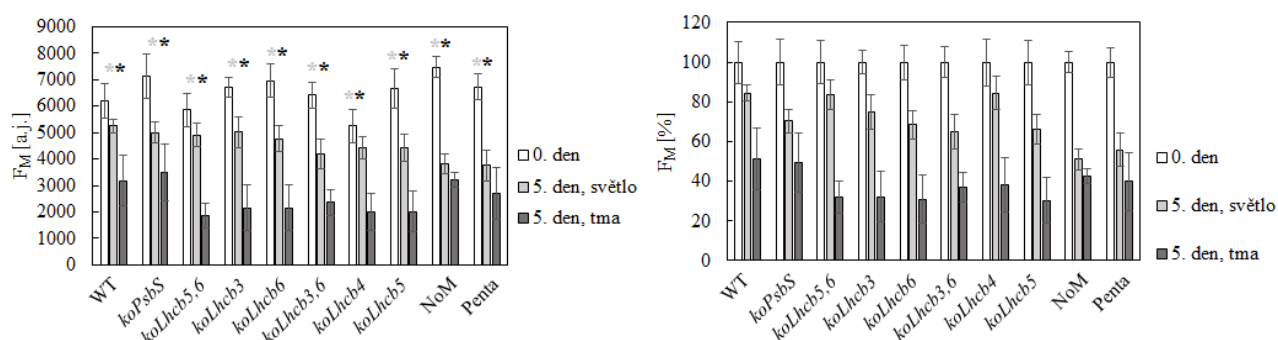


Obr. 36: Naměřené a relativní hodnoty (v %) parametru  $F_0$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den, relativní hodnoty = 100 %), 5. den po oddělení a následné inkubaci na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ . Hvězdičky (\*; šedá při srovnávání kontroly a listů inkubovaných na světle, černá při srovnávání kontroly a listů inkubovaných ve tmě) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u čerstvě oddělených listů (0. den); hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .

Hodnoty parametru  $F_M$  byly 5. den po inkubaci na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) i ve tmě ve srovnání s 0. dnem sníženy. K výraznějšímu snížení došlo u listů inkubovaných 5 dnů ve tmě. U parametru  $F_M$  nebyly u listů z 0. dne ani u listů inkubovaných 5 dnů na světle pozorovány žádné větší rozdíly mezi jednotlivými genotypy. Hodnoty  $F_M$  byly u jednotlivých listů inkubovaných 5 dnů ve tmě heterogenní (Obr. 37, 38).



Obr. 37: Zobrazení parametru  $F_M$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den), 5. den po oddělení a následné inkubaci na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě.



Obr. 38: Naměřené a relativní hodnoty (v %) parametru  $F_M$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den, relativní hodnoty = 100 %), 5. den po oddělení a následné inkubaci na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ . Hvězdičky (\*; šedá při srovnávání kontroly a listů inkubovaných na světle, černá při srovnávání kontroly a listů inkubovaných ve tmě) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u čerstvě oddělených listů (0. den); hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .



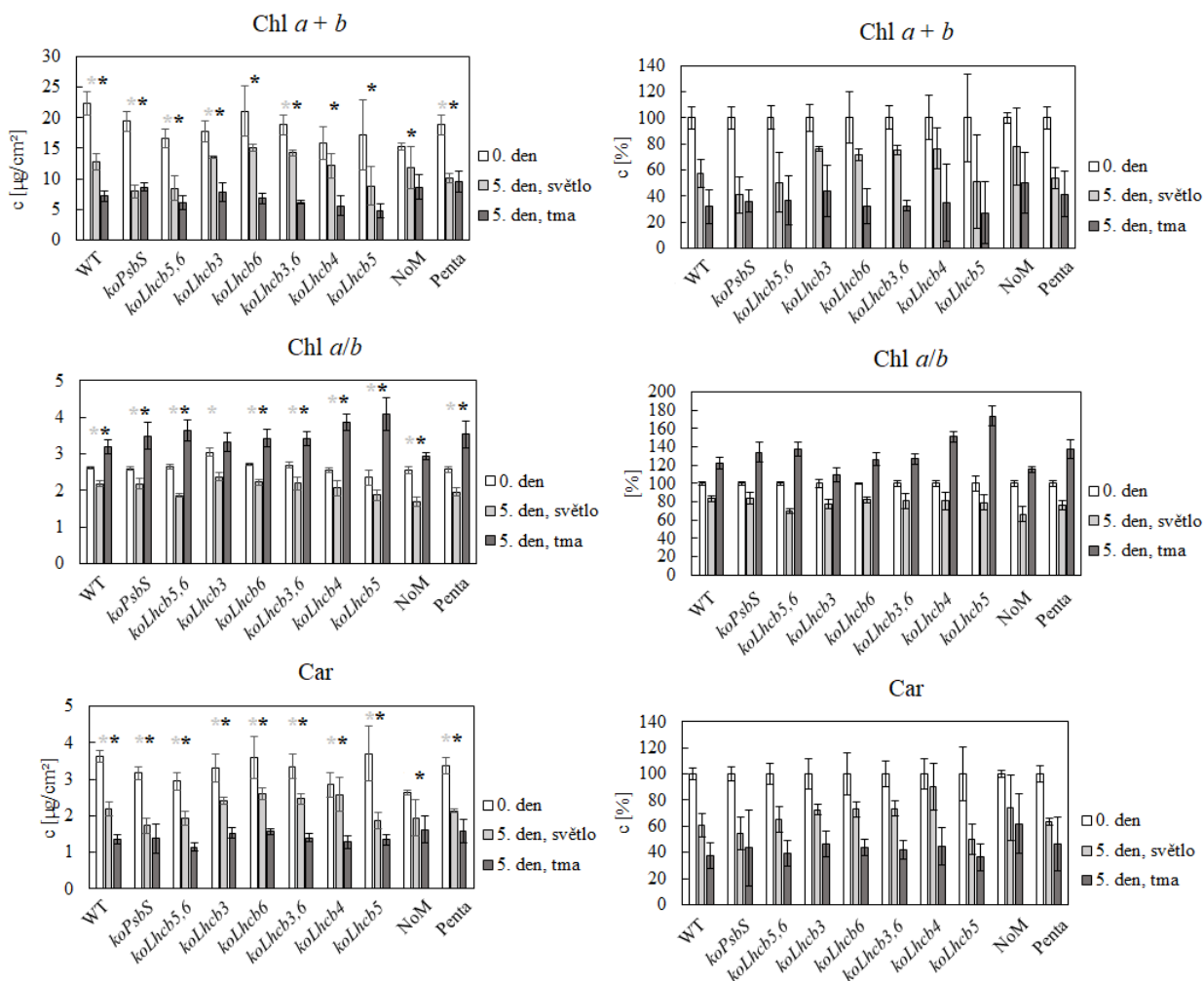
#### 4.2.2 Obsah fotosyntetických pigmentů

Pomocí spektrofotometrické analýzy byl u kontrolních oddělených listů (0. den), listů inkubovaných 5 dnů na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) a listů inkubovaných 5 dnů ve tmě stanoven součet obsahů chlorofylů *a* a *b*, poměr chlorofylů *a/b* a obsah karotenoidů (Obr. 39).

Hodnoty obsahu chlorofylu (chl *a + b*) vztaženého na plochu listu se 0. den pohybovaly přibližně v rozmezí 15 až 23  $\mu\text{g/cm}^2$ . Pátý den došlo u listů inkubovaných na světle k poklesu a hodnoty se pohybovaly mezi 8 až 15  $\mu\text{g/cm}^2$ , což představuje pokles o 20–60 %. K poklesu došlo také u listů inkubovaných 5 dnů ve tmě a hodnoty se pohybovaly mezi 5 až 8  $\mu\text{g/cm}^2$  (ve srovnání s kontrolou pokles o 60–80 %). Pokles obsahu chlorofylu se poměrně výrazně lišil u jednotlivých listů daného genotypu, což se projevilo relativně velkým rozptylem naměřených hodnot.

U poměru chlorofylů *a/b* nebyly 0. den pozorovány žádné větší rozdíly mezi jednotlivými genotypy. Pátý den po inkubaci listů na světle došlo ve srovnání s 0. dnem k mírnému snížení tohoto poměru u všech genotypů, což indikuje mírně větší úbytek reakčních center ve srovnání s LHC. Pátý den po inkubaci listů ve tmě nastalo naopak zvýšení poměru chl *a/b* u všech genotypů, k nejvyššími nárůstu došlo u genotypů *koLhcb4* a *koLhcb5*. Vyšší hodnoty u listů inkubovaných ve tmě znamenají, že se rychleji degradoval chlorofyl *b* než chlorofyl *a*, což odráží rychlejší úbytek LHC oproti reakčním centrům.

Při analýze obsahu karotenoidů byly 0. den zaznamenány hodnoty v rozmezí 3–3,7  $\mu\text{g/cm}^2$ . Pátý den došlo u listů inkubovaných na světle k poklesu a hodnoty se pohybovaly mezi 2 až 2,5  $\mu\text{g/cm}^2$  (pokles o 10–50 %). Nejmenší pokles nastal u *koLhcb4*. K poklesu došlo také u listů inkubovaných 5 dnů ve tmě a hodnoty se pohybovaly mezi 1 až 1,6  $\mu\text{g/cm}^2$  (ve srovnání s kontrolou pokles o 40–60 %).



Obr. 39: Absolutní obsah chlorofylů (Chl  $a + b$ ), poměr mezi obsahy chlorofylů (Chl  $a/b$ ), obsah karotenoidů (Car) a relativní obsah chlorofylů, poměr mezi obsahy chlorofylů, obsah karotenoidů (vyjádřené v %) naměřené v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den, relativní hodnoty = 100 %), 5. den po oddělení a následné inkubaci na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Uvedeny průměry a SD,  $n = 3$ . Hvězdičky (\*; šedá při srovnávání kontroly a listů inkubovaných na světle, černá při srovnávání kontroly a listů inkubovaných ve tmě) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u čerstvě oddělených listů (0. den); hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .

#### 4.2.3 Parametry $\Phi_P$ , NPQ a $1 - q_P$

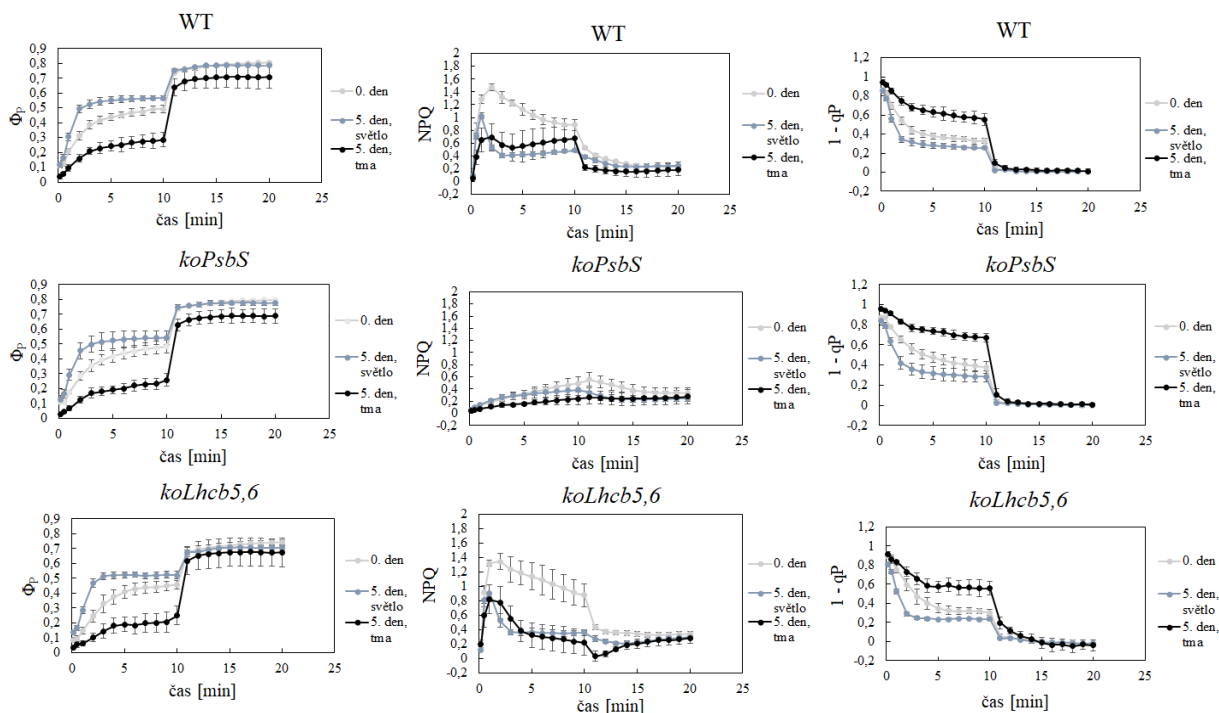
Obrázky 40, 41 a 42 znázorňují průběhy parametrů  $\Phi_P$ , NPQ a  $1 - q_P$  naměřené u všech genotypů 0. den, 5. den po inkubaci listů na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 5. den po inkubaci listů ve tmě.

Průběh parametru  $\Phi_P$  vykazoval při zapnutém aktinickém světle postupný nárůst, 0. den se hodnoty pohybovaly kolem 0,25–0,45, 5. den po inkubaci listů na světle mezi 0,3–0,6 a 5. den po inkubaci listů ve tmě okolo 0,05–0,3. Ve srovnání s kontrolou byl u listů inkubovaných 5 dnů na světle pozorován rychlejší nárůst a vyšší maximální hodnota  $\Phi_P$ , u listů inkubovaných 5 dnů ve tmě pak došlo ke zpomalení nárůstu a snížení maximální hodnoty  $\Phi_P$ .

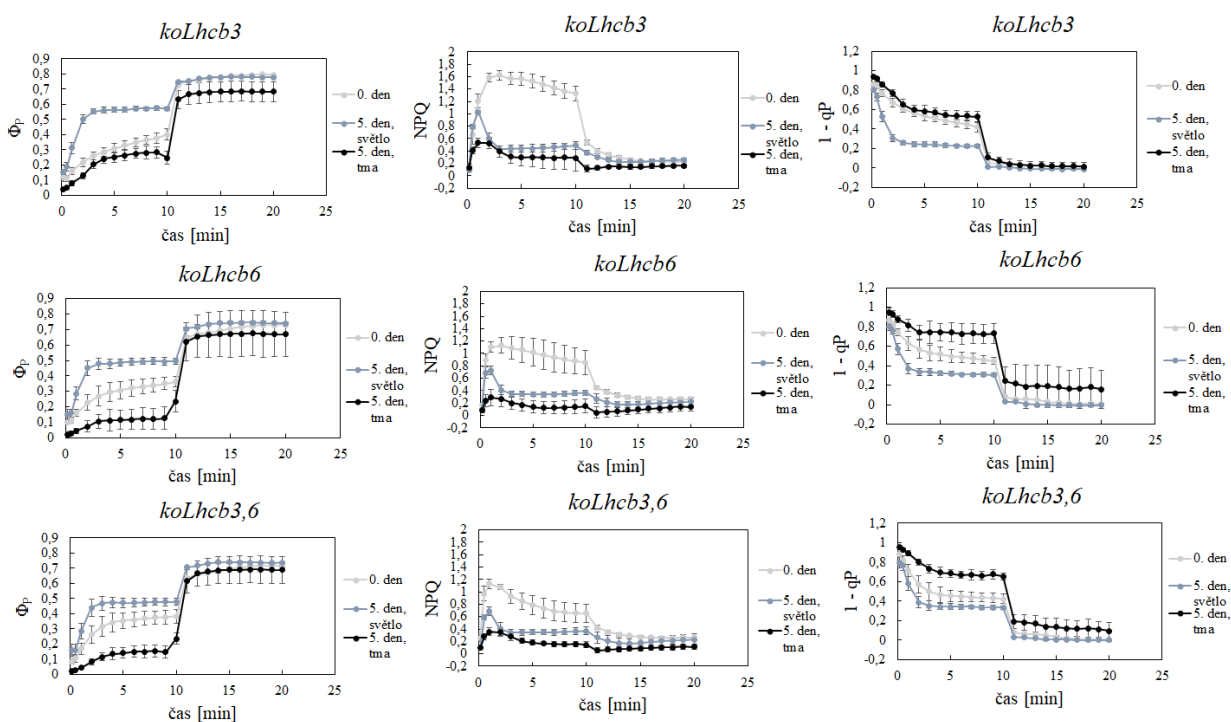
Nejnižší hodnoty  $\Phi_P$  po 5 dnech ve tmě měly genotypy *koLhcb6* a *koLhcb3,6*. Po vypnutí aktinického světla nastal skokový nárůst hodnot – u listů z 0. dne k hodnotám mezi 0,55–0,8, u listů po inkubaci na světle k 0,55–0,8 a u listů inkubovaných ve tmě k 0,6–0,7.

Průběh NPQ během indukce a relaxace se u kontrolních listů různých genotypů lišil. Nárůst a mírný pokles NPQ během indukce a následný pokles po vypnutí aktinického světla byl zjištěn u WT, *koLhcb5,6*, *koLhcb3*, *koLhcb6*, *koLhcb4*, *koLhcb5* a Penta. U genotypů *koLhcb3,6* a NoM byl pokles po vypnutí světla minimální ve srovnání s předchozími genotypy. Velmi pomalý nárůst NPQ bez poklesu jak během indukce, tak během relaxace ve tmě byl zjištěn u *koPsbS*. Maximální hodnoty NPQ se u kontrolních listů při zapnutém aktinickém světle pohybovaly okolo 0,6–1,6, u listů inkubovaných na světle kolem 0,4–1 a u listů inkubovaných ve tmě v rozmezí 0,2–1. Po vypnutí aktinického světla nastal u kontrolních listů pokles k hodnotám 0,2–0,4, u listů inkubovaných na světle k 0–0,2 a u listů inkubovaných ve tmě k 0–0,2. Ve srovnání s 0. dnem, kdy docházelo zpočátku k rychlému nárůstu, a poté k mírnému a postupnému poklesu, vykazovaly průběhy tohoto parametru 5. den u listů inkubovaných na světle i ve tmě u většiny genotypů rychlý nárůst, a poté rychlý pokles (méně prudký pokles u *koLhcb6*, *koLhcb3,6*, *koLhcb4*, NoM, Penta), a to již při zapnutém aktinickém světle. Po vypnutí aktinického světla došlo ke skokovému poklesu a průběhy z 0. i 5. dne se držely na podobných hodnotách.

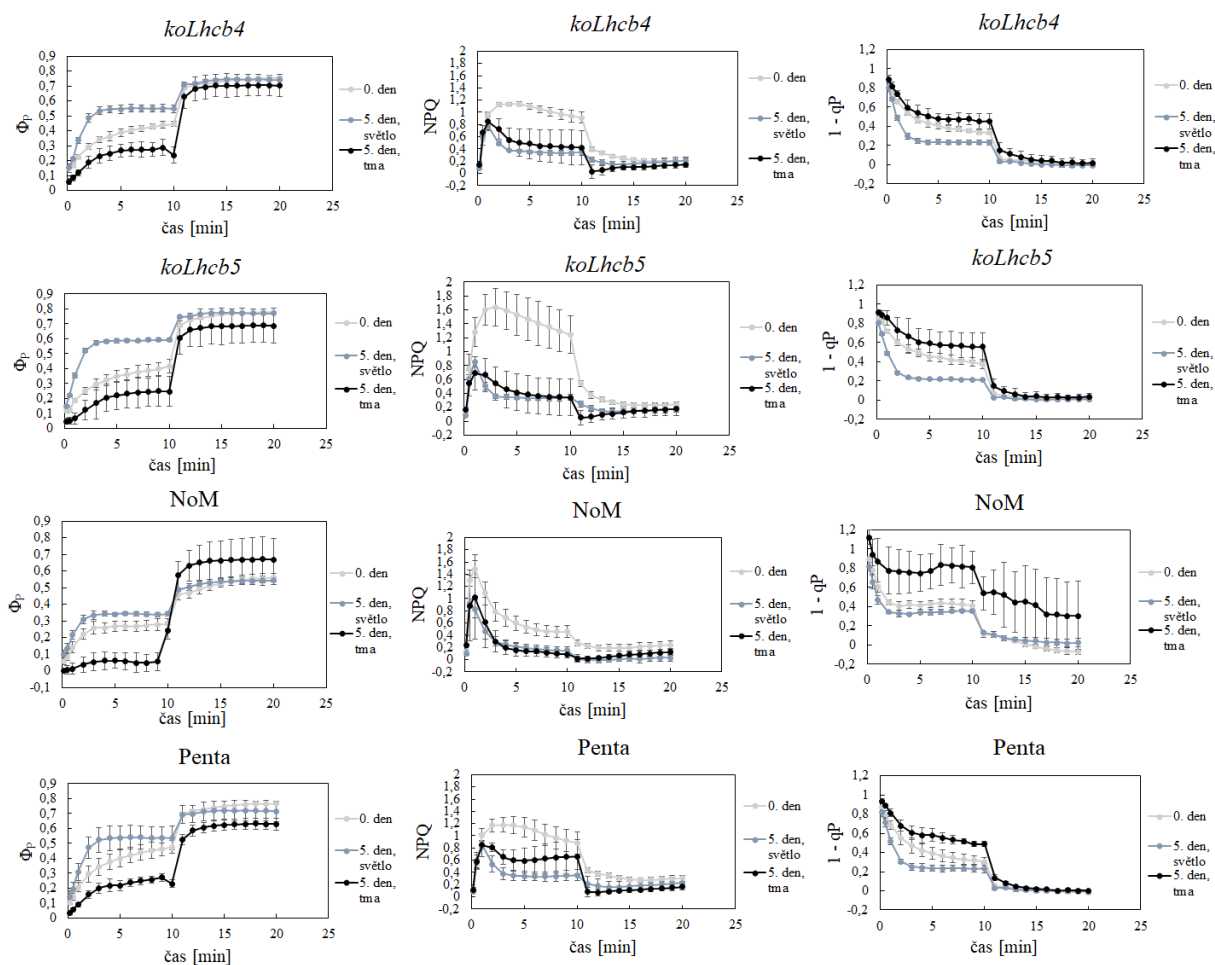
Průběh parametru  $1 - qP$  vykazoval při zapnutém aktinickém světle postupný pokles – 0. den se hodnoty pohybovaly od 0,3 po 1, 5. den po inkubaci listů na světle od 0,2 po 0,8 (menší redukce PQ poolu ve srovnání s kontrolou) a 5. den po inkubaci listů ve tmě od 0,5 po 1 (větší redukce PQ poolu ve srovnání s 0. dnem). Po vypnutí aktinického světla nastal skokový pokles – u listů z 0. dne a 5. dne po inkubaci listů na světle i ve tmě k hodnotám kolem 0 (s výjimkou genotypu NoM, kde se hodnoty u listů inkubovaných ve tmě pohybovaly okolo 0,3–0,5). Nebyly pozorovány žádné větší rozdíly mezi genotypy navzájem.



Obr. 40: Parametry  $\Phi_p$ , NPQ a  $1 - qP$  naměřené v oddělených listech genotypů WT, *koPsbS* a *koLhcb5,6* rostlin *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den), 5. den po oddělení a následné inkubaci na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Prvních 10 minut bylo měřeno při aktinickém světle ( $200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), následujících 10 minut po vypnutí aktinického světla. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .



Obr. 41: Parametry  $\Phi_p$ , NPQ a  $1 - qP$  naměřené v oddělených listech genotypů *koLhcb3*, *koLhcb6* a *koLhcb3,6* rostlin *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den), 5. den po oddělení a následné inkubaci na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Prvních 10 minut bylo měřeno při aktinickém světle ( $200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), následujících 10 minut po vypnutí aktinického světla. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .



Obr. 42: Parametry  $\Phi_p$ , NPQ a  $1 - qP$  naměřené v oddělených listech genotypů *koLhcb4*, *koLhcb5*, NoM a Penta rostlin *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den), 5. den po oddělení a následné inkubaci na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Prvních 10 minut bylo měřeno při aktinickém světle ( $200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), následujících 10 minut po vypnutí aktinického světla. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .

### 4.3 Experiment 3

V experimentu 3 bylo provedeno analytické stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů a měření parametrů chlorofylové fluorescence u oddělených listů 10 genotypů rostliny *A. thaliana* L., a to bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Při měření chlorofylové fluorescence pomocí přístroje FluorCam byly sledovány parametry  $F_V/F_M$ ,  $F_0$ ,  $F_M$ ,  $\Phi_p$ , NPQ a  $1 - qP$  a bylo použito aktinické světlo o intenzitě  $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Při měření oxidace PSI pomocí přístroje DualPAM byly sledovány parametry  $Y(I)$ ,  $Y(ND)$  a  $Y(NA)$ . Během měření, které trvalo 3 minuty, bylo použito aktinické světlo o intenzitě  $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a pulsy saturačního světla o intenzitě  $10\,000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 4.3.1 Obrazové záznamy parametrů $F_v/F_M$ , $F_0$ a $F_M$

Oddělené listy byly vždy po změření parametrů chlorofylové fluorescence na přístroji FluorCam vyfotografovány (Obr. 43).

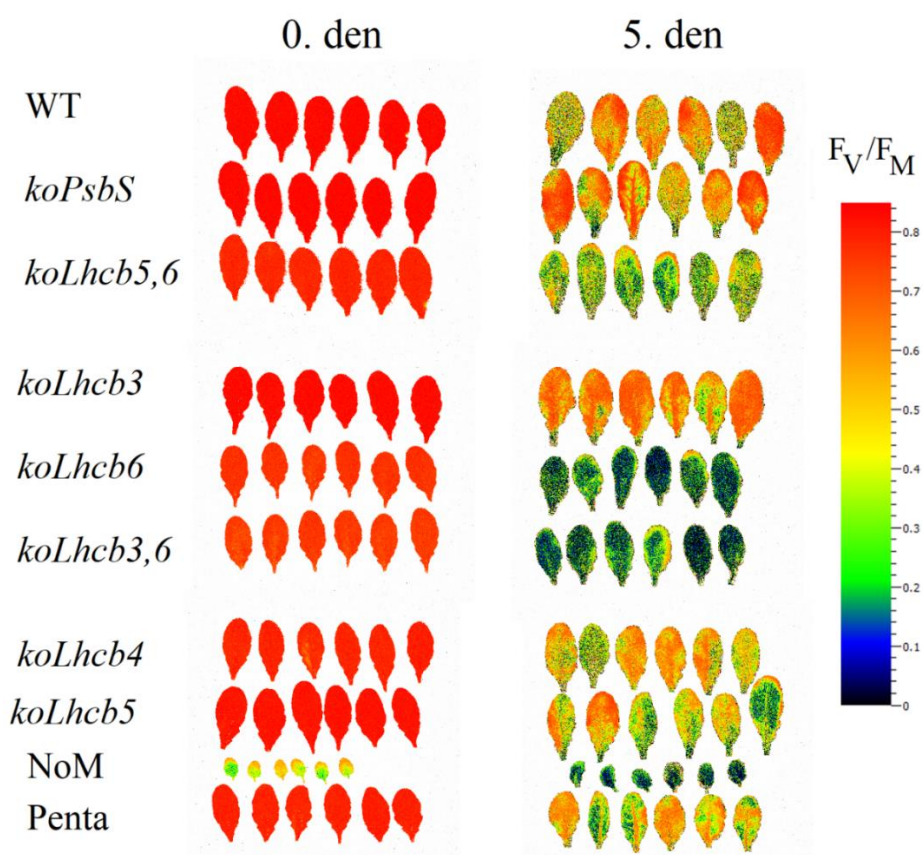
Čerstvě oddělené listy (z 0. dne) byly výrazně zelené. Listy genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* byly v porovnání s WT mírně menší. Listy genotypu NoM byly v porovnání s ostatními genotypy výrazně menší.

Listy inkubované 5 dnů ve tmě zežloutly, což indikuje spuštění procesu senescence. Vizually nebyly mezi jednotlivými genotypy pozorovány žádné větší rozdíly ve žlutosti listů.

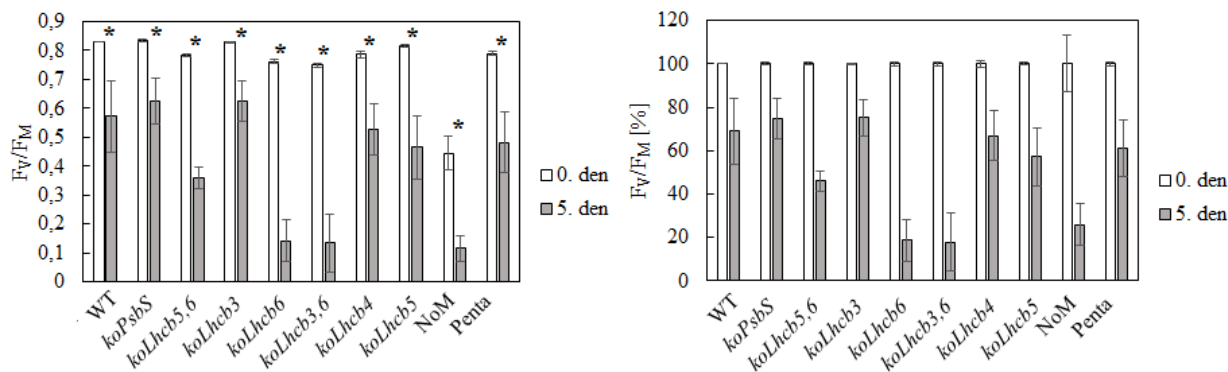


Obr. 43: Fotografie oddělených listů 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě.

Parametr  $F_V/F_M$  se u kontrolních rostlin všech genotypů (0. den), s výjimkou genotypu NoM, pohyboval okolo hodnoty 0,8. U genotypu NoM byl parametr  $F_V/F_M$  snížen na hodnotu 0,45 (snížení o 40 %). Mírně nižší hodnoty  $F_V/F_M$  byly zjištěny u genotypů *koLhcb5,6*, *koLhcb6* a *koLhcb3,6*. Po inkubaci oddělených listů 5 dnů ve tmě došlo k poklesu parametru  $F_V/F_M$  u všech genotypů na hodnoty mezi 0,1–0,6. Nejvyšší pokles byl pozorován u genotypů *koLhcb6*, *koLhcb3,6* a NoM, a to až o 80 %. Naopak nejnižší pokles hodnot tohoto parametru byl zaznamenán u genotypů WT, *koPsbS* a *koLhcb3* (o 25–30 %). Hodnoty  $F_V/F_M$  byly u jednotlivých listů inkubovaných 5 dnů ve tmě heterogenní (Obr. 44, 45).

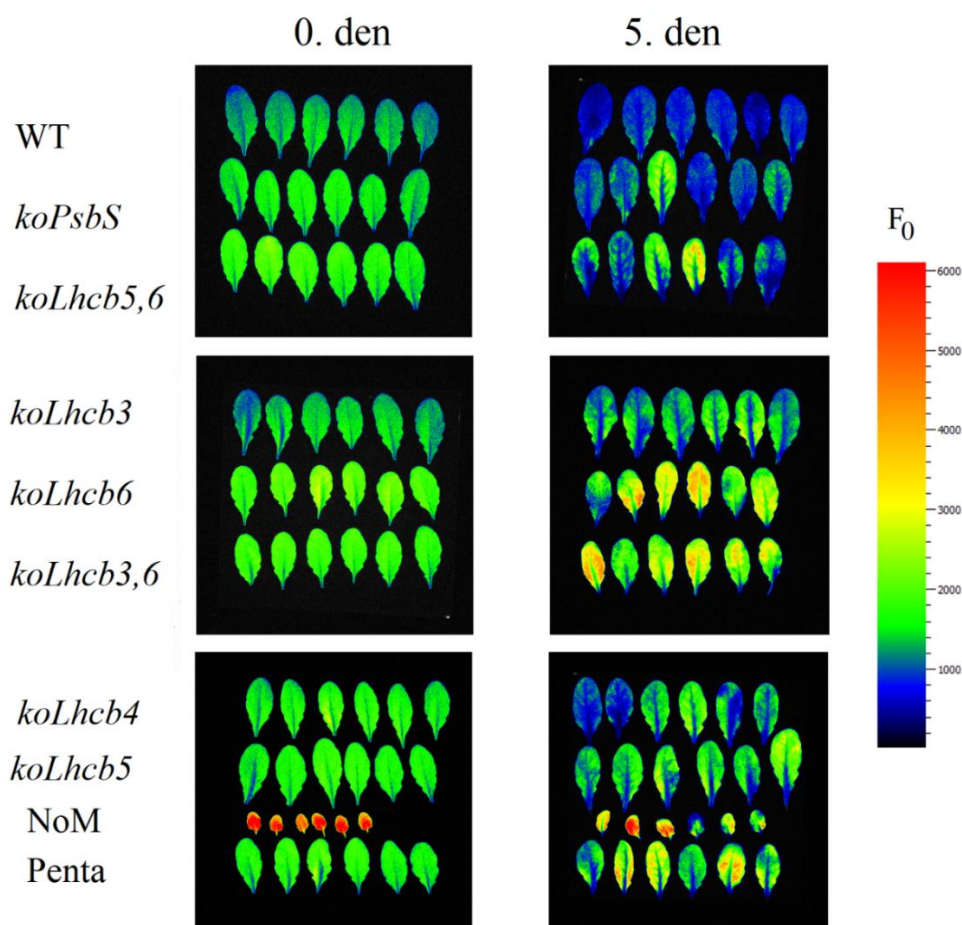


Obr. 44: Zobrazení parametru  $F_V/F_M$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě.



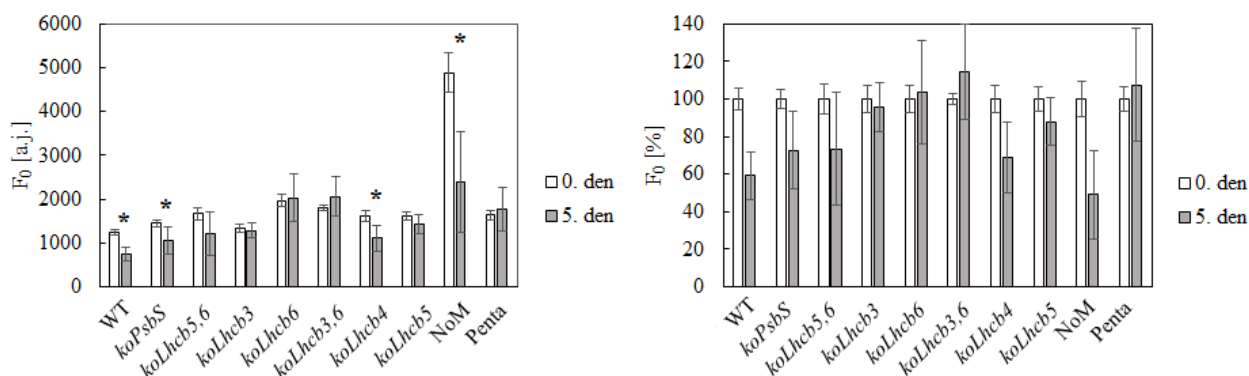
Obr. 45: Naměřené a relativní hodnoty (v %) parametru  $F_v/F_m$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den, relativní hodnoty = 100 %) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ . Hvězdičky (\*) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u čerstvě oddělených listů (0. den); hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .

Parametr  $F_0$  se 0. den u většiny genotypů pohyboval okolo hodnoty 1500, u genotypu NoM byla naměřena hodnota kolem 4800. Pátý den došlo ve srovnání s 0. dnem k nárůstu hodnot u genotypů *koLhcb6*, *koLhcb3,6* a Penta, a to až o 25 %. U ostatních genotypů byly 5. den naměřeny ve srovnání s 0. dnem nižší hodnoty parametru  $F_0$ . Hodnoty  $F_0$  byly u jednotlivých listů inkubovaných 5 dnů ve tmě heterogenní (Obr. 46, 47).



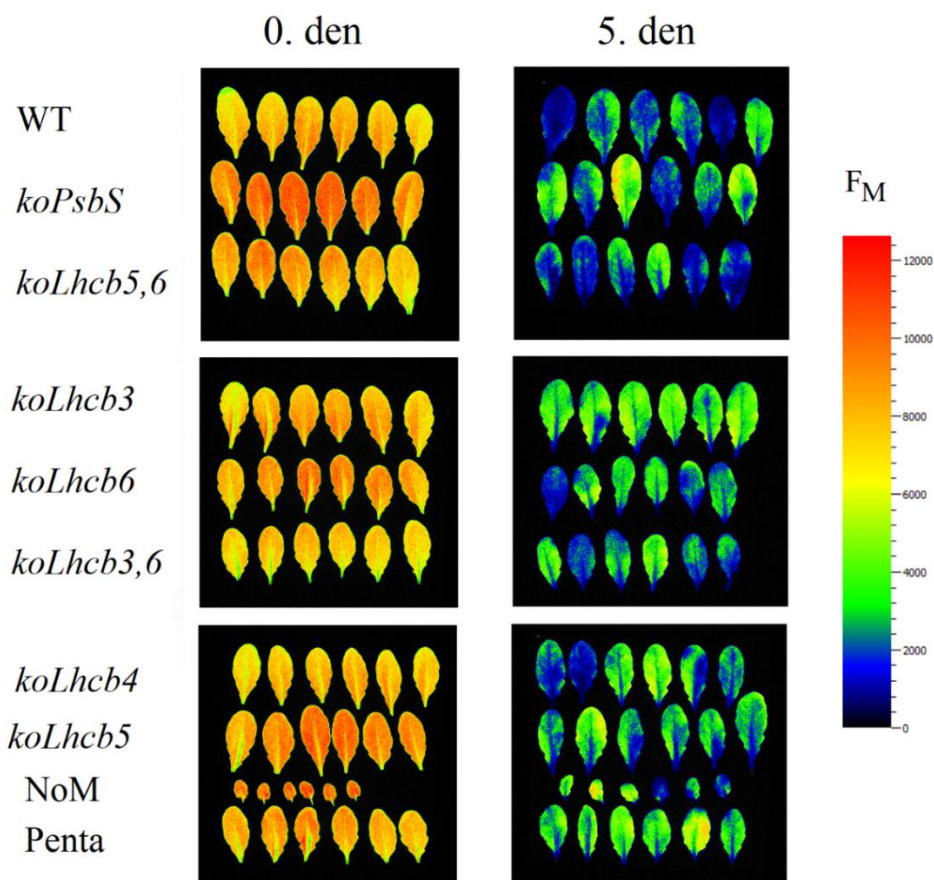
Obr. 46: Zobrazení parametru  $F_0$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě.



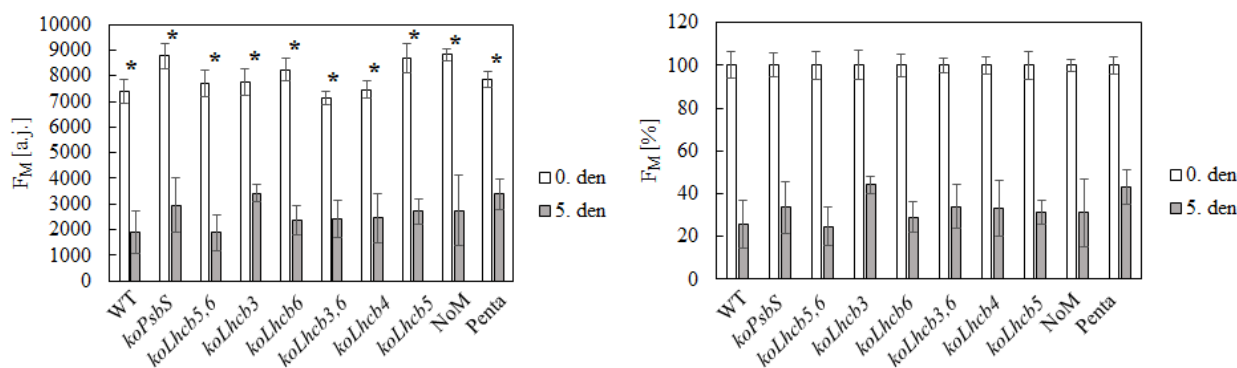


Obr. 47: Naměřené a relativní hodnoty (v %) parametru  $F_0$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den, relativní hodnoty = 100 %) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ . Hvězdičky (\*) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u čerstvě oddělených listů (0. den); hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .

Parametr  $F_M$  se 0. den u většiny genotypů pohyboval okolo 7000–9000. Hodnoty parametru  $F_M$  byly 5. den ve srovnání s 0. dnem sníženy o 60–80 % (2000–3500). U parametru  $F_M$  nebyly 0. ani 5. den pozorovány žádné větší rozdíly mezi jednotlivými genotypy. Hodnoty  $F_M$  byly u jednotlivých listů inkubovaných 5 dnů ve tmě heterogenní (Obr. 48, 49).



Obr. 48: Zobrazení parametru  $F_M$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě.



Obr. 49: Naměřené a relativní hodnoty (v %) parametru  $F_M$  v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den, relativní hodnoty = 100 %) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ . Hvězdičky (\*) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u čerstvě oddělených listů (0. den); hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .

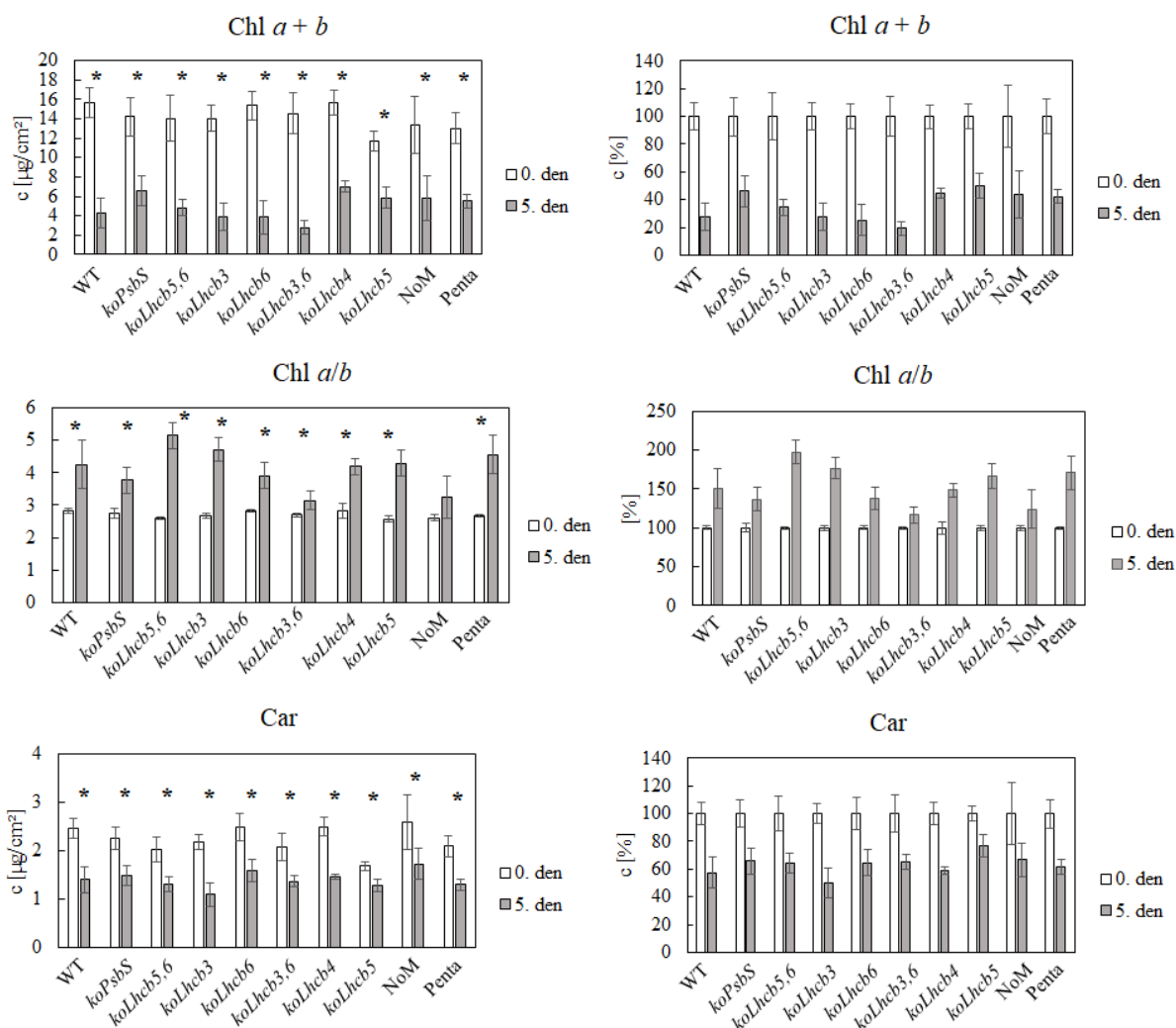
### 4.3.2 Obsah fotosyntetických pigmentů

Pomocí spektrofotometrické analýzy byl u kontrolních listů (0. den) a listů inkubovaných 5 dnů ve tmě stanoven součet obsahů chlorofylů *a* a *b*, poměr chlorofylů *a/b* a obsah karotenoidů (Obr. 50).

Hodnoty obsahu chlorofylu (chl *a* + *b*) vztaženého na plochu listu se 0. den pohybovaly přibližně v rozmezí 12 až 16  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Pátý den došlo k poklesu a hodnoty se pohybovaly mezi 3 až 7  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , byl tedy pozorován pokles o 50–80 %.

U hodnot poměru chlorofylů *a/b* nebyly 0. den pozorovány žádné větší rozdíly mezi jednotlivými genotypy. Pátý den nastalo zvýšení tohoto poměru u všech genotypů, a to o 20 (u *koLhcb3,6*) až 100 % (u *koLhcb5,6*). Vyšší hodnoty u listů z 5. dne znamenají, že během inkubace ve tmě rychleji degradovaly LHC v porovnání s reakčními centry.

Při analýze obsahu karotenoidů byly 0. den zaznamenány hodnoty v rozmezí 2–2,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Pátý den došlo k poklesu obsahu karotenoidů přibližně o 20–50 %.



Obr. 50: Absolutní obsah chlorofylů (Chl  $a + b$ ), poměr mezi obsahy chlorofylů (Chl  $a/b$ ), obsah karotenoidů (Car) a relativní obsah chlorofylů, poměr mezi obsahy chlorofylů, obsah karotenoidů (vyjádřené v %) naměřené v oddělených listech 10 genotypů *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den, relativní hodnoty = 100 %) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Uvedeny průměry a SD,  $n = 3$ . Hvězdičky (\*) označují statisticky významně odlišné hodnoty od hodnot naměřených u čerstvě oddělených listů (0. den); hladina významnosti  $p \leq 0,05$ .

#### 4.3.3 Parametry $\Phi_P$ , NPQ a $1 - q_P$

Obrázky 51, 52 a 53 znázorňují průběhy parametrů  $\Phi_P$ , NPQ a  $1 - q_P$  naměřené u všech genotypů 0. a 5. den po inkubaci ve tmě.

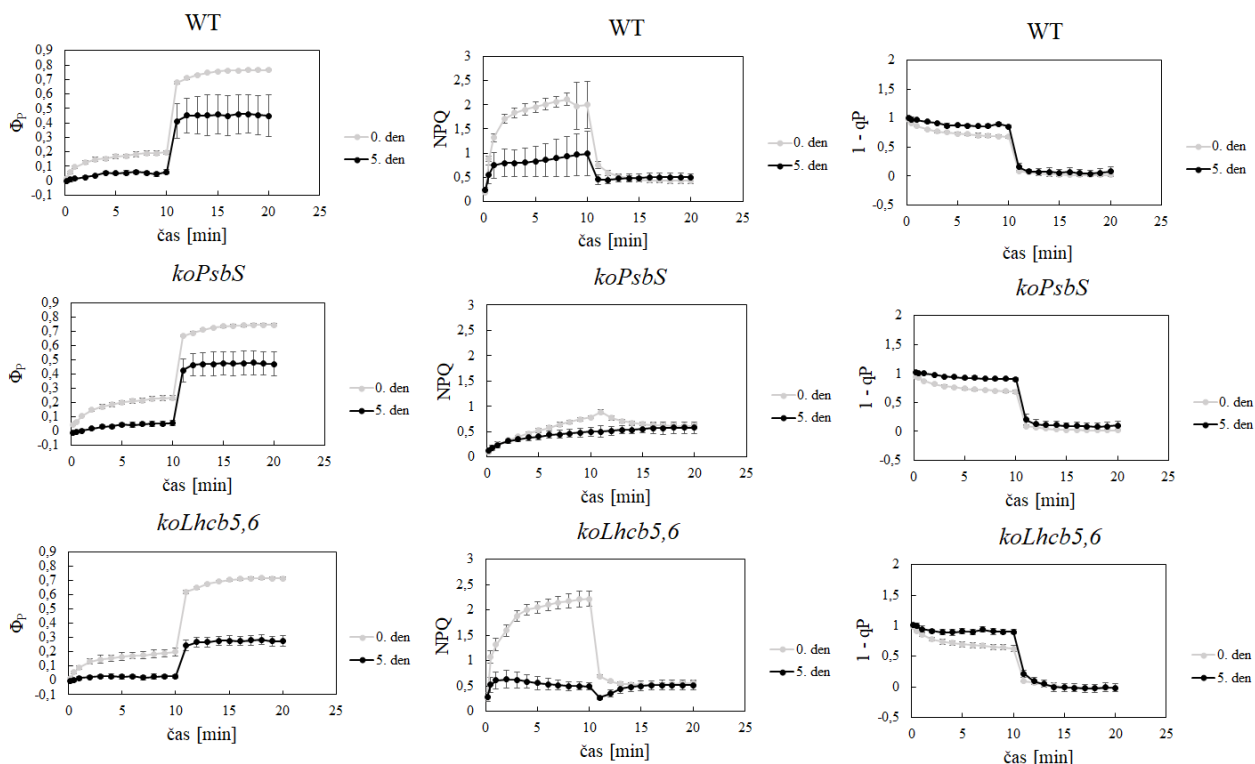
Vzhledem k použití aktinického světla vyšší intenzity během měření (800  $\mu\text{mol}$  fotonů  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , tj. 8krát vyšší než pěstební světlo, použito z důvodu posouzení reakce mutantních genotypů na světlo vyšší intenzity), byly pozorovány relativně nízké hodnoty  $\Phi_P$  a relativně vysoké hodnoty NPQ i u kontrolních listů (0. den).

Parametr  $\Phi_P$  se při zapnutém aktinickém světle pohyboval 0. den okolo hodnot 0 (NoM) až 0,2 (WT, *koPsbS*, *koLhcb5,6*) a 5. den okolo 0. Po vypnutí aktinického světla nastalo skokové zvýšení hodnot – u listů z 0. dne k hodnotám mezi 0,3 (NoM) až 0,8 (WT, *koPsbS*, *koLhcb3*)

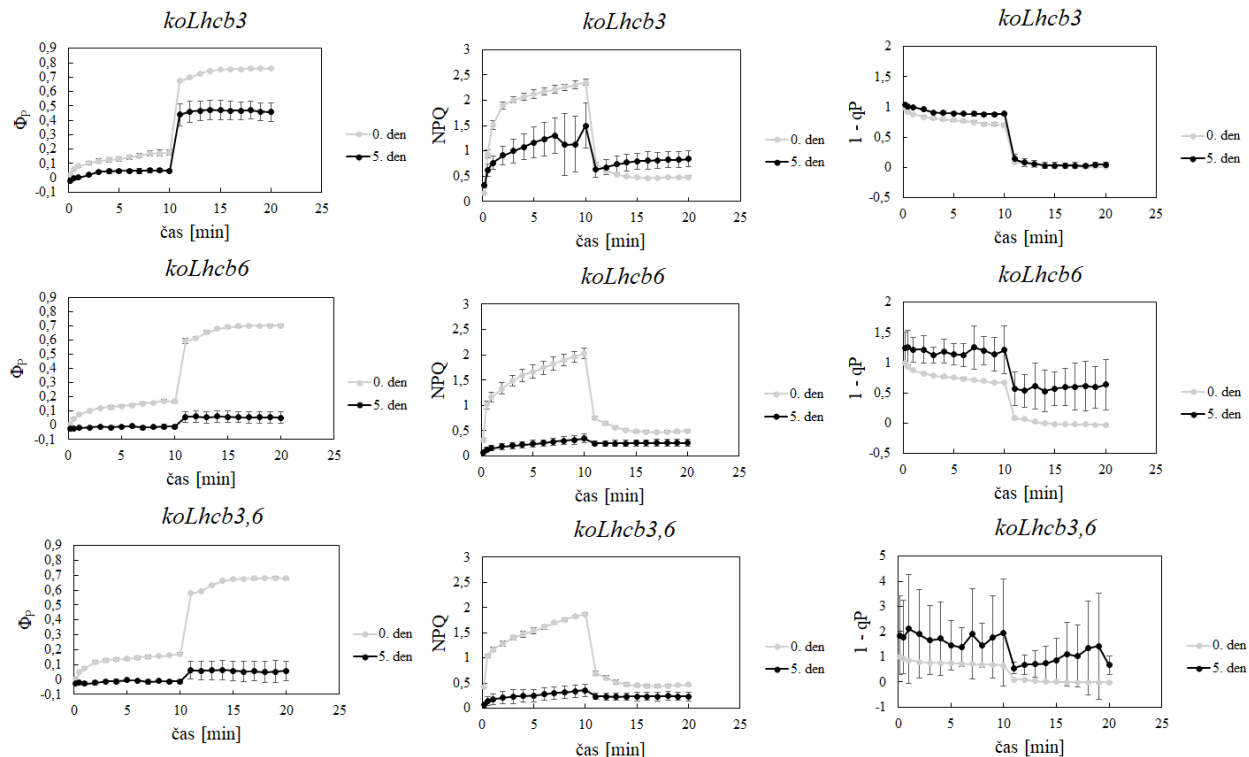
a u listů z 5. dne k hodnotám mezi 0 (*koLhcb6*, *koLhcb3,6*, NoM) až 0,5 (WT, *koPsbS*, *koLhcb3*). Nízké hodnoty  $\Phi_P$  (obzvláště po vypnutí aktinického světla) indikovaly výraznou inhibici fotochemie PSII. Pokud by PSII fungoval normálně, parametr  $\Phi_P$  by po vypnutí aktinického světla narůstal k hodnotám okolo 0,8.

Maximální hodnoty NPQ se u kontrolních listů většiny genotypů při zapnutém aktinickém světle pohybovaly okolo 2–2,5. Po vypnutí aktinického světla nastal u všech genotypů pokles k hodnotě 0,5. U genotypu NoM byl pozorován dvojitý nárůst k hodnotě 1,5, poté došlo k poklesu k hodnotě 0,5. Maximální hodnoty NPQ se u listů z 5. dne při zapnutém aktinickém světle pohybovaly okolo 0,5–1,5. Nejnižší nárůst (k hodnotě 0,5) byl zaznamenán u genotypů *koPsbS*, *koLhcb5,6*, *koLhcb6*, *koLhcb3,6* a NoM. Nejvyšší nárůst (k hodnotě 1,5) byl zjištěn u genotypu *koLhcb3*. Po vypnutí aktinického světla nastal pokles k hodnotám 0,25 (*koLhcb6*, *koLhcb3,6* a NoM) až 0,5. Ve srovnání s 0. dnem vykazovaly průběhy tohoto parametru 5. den u všech genotypů během indukce menší nárůst. Velmi pomalý nárůst NPQ bez náznaku poklesu během relaxace ve tmě byl zjištěn u *koPsbS*.

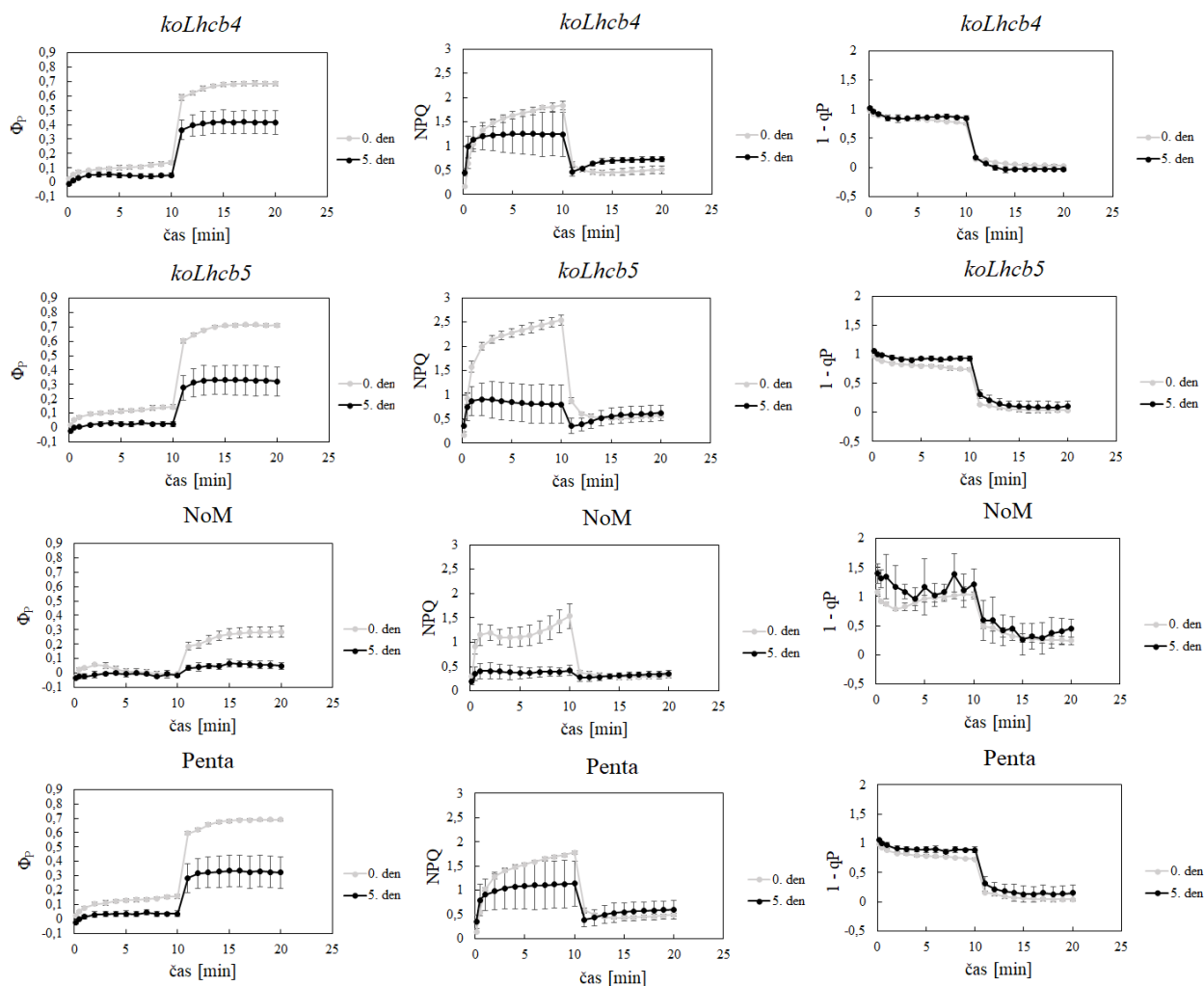
Hodnoty parametru  $1 - qP$  se při zapnutém aktinickém světle pohybovaly u většiny genotypů 0. i 5. den okolo 1, což odráží maximálně redukovaný PQ pool v důsledku použití vysoké intenzity světla. Hodnoty vyšší než 1 (u *koLhcb6*, *koLhcb3,6*, NoM) indikují závažné poškození fotosyntetického aparátu, kdy již nefunguje PSII ani přenos elektronů za PSII. Po vypnutí aktinického světla došlo k poklesu tohoto parametru na hodnoty okolo 0. Průběhy tohoto parametru u jednotlivých genotypů byly pro 0. i 5. den téměř totožné. Nebyly pozorovány větší rozdíly mezi genotypy navzájem.



Obr. 51: Parametry  $\Phi_p$ , NPQ a  $I - qp$  naměřené v oddělených listech genotypů WT, *koPsbS* a *koLhcb5,6* rostlin *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následně inkubaci ve tmě. Prvních 10 minut bylo měřeno při aktinickém světle ( $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), následujících 10 minut po vypnutí aktinického světla. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .



Obr. 52: Parametry  $\Phi_p$ , NPQ a  $I - qp$  naměřené v oddělených listech genotypů *koLhcb3*, *koLhcb6* a *koLhcb3,6* rostlin *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následně inkubaci ve tmě. Prvních 10 minut bylo měřeno při aktinickém světle ( $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), následujících 10 minut po vypnutí aktinického světla. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .



Obr. 53: Parametry  $\Phi_p$ , NPQ a  $1 - qp$  naměřené v oddělených listech genotypů *koLhcb4*, *koLhcb5*, NoM a Penta rostlin *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Prvních 10 minut bylo měřeno při aktinickém světle ( $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), následujících 10 minut po vypnutí aktinického světla. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .

#### 4.3.4 Parametry Y(I), Y(ND) a Y(NA)

Pro posouzení funkce PSI byla měřena oxidace P700. Následně byly analyzovány průběhy parametrů: Y(I) – efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSI, Y(ND) – kvantový výtěžek nefotochemické disipace energie daný limitací na donorové straně PSI a Y(NA) – kvantový výtěžek nefotochemické disipace energie daný limitací na akceptorové straně PSI. Obecně platí vztah:  $Y(I) + Y(ND) + Y(NA) = 1$ . P700 je u vzorků adaptovaných na tmu plně redukován (Y(I) se blíží 1, Y(ND) a Y(NA) 0). Po osvětlení dochází v důsledku přenosu elektronu na (oxidovaný) akceptor k oxidaci P700 ( $\text{P700}^+$ ) (Y(ND) se blíží 1, Y(I) a Y(NA) 0, přičemž Y(ND) představuje podíl celkového P700, který může být oxidován. Vzápětí nastává situace, kdy se Y(NA) blíží 1, Y(I) a Y(ND) 0, přičemž Y(NA) představuje podíl celkového P700, který nemůže být oxidován z důvodu nedostatku oxidovaných

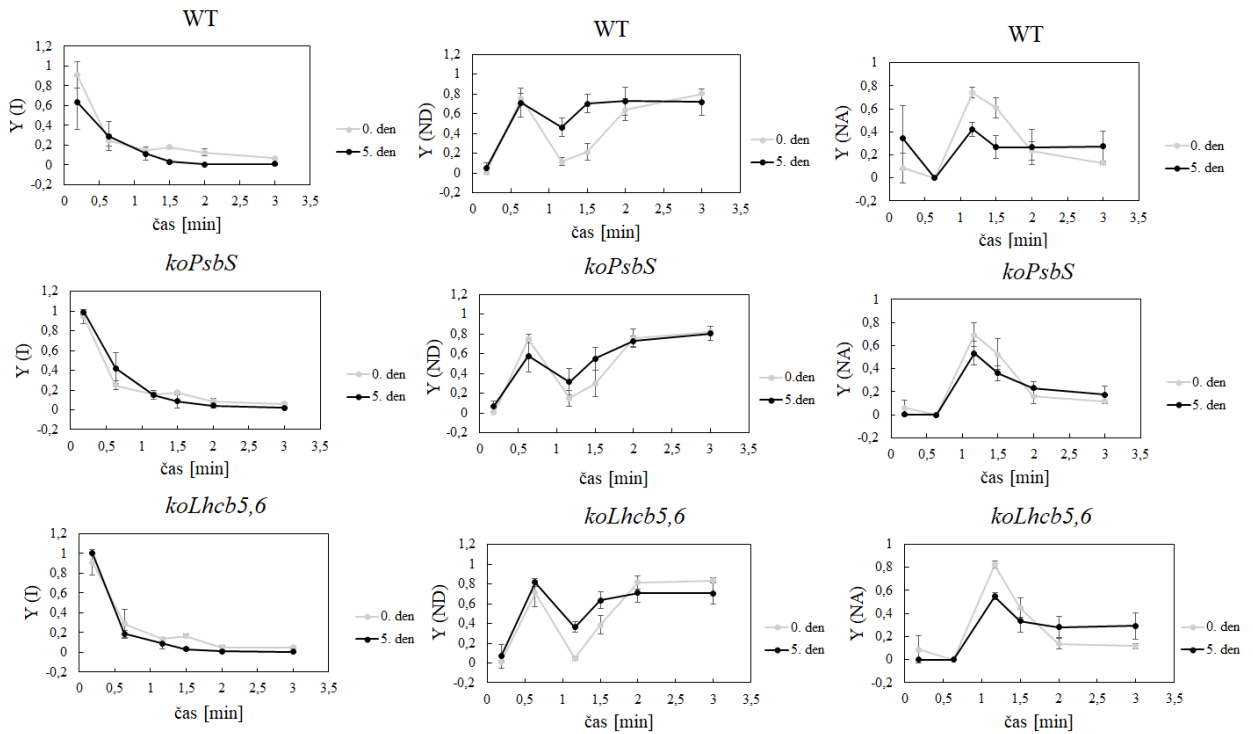
akceptorů), přijetím elektronu z PSII je P700 opět redukován (jakmile jsou již přítomny oxidované akceptory).

Průběhy parametru Y(I) vykazovaly 0. den u většiny genotypů postupný pokles z hodnoty 1 k 0 (u genotypu NoM z hodnoty 0,8 k 0). Pátý den došlo u některých genotypů ke snížení počátečních hodnot (u WT, *koLhcb3* a *koLhcb3,6* na 0,6; u *koLhcb6* na 0,8 a u NoM na 0,1).

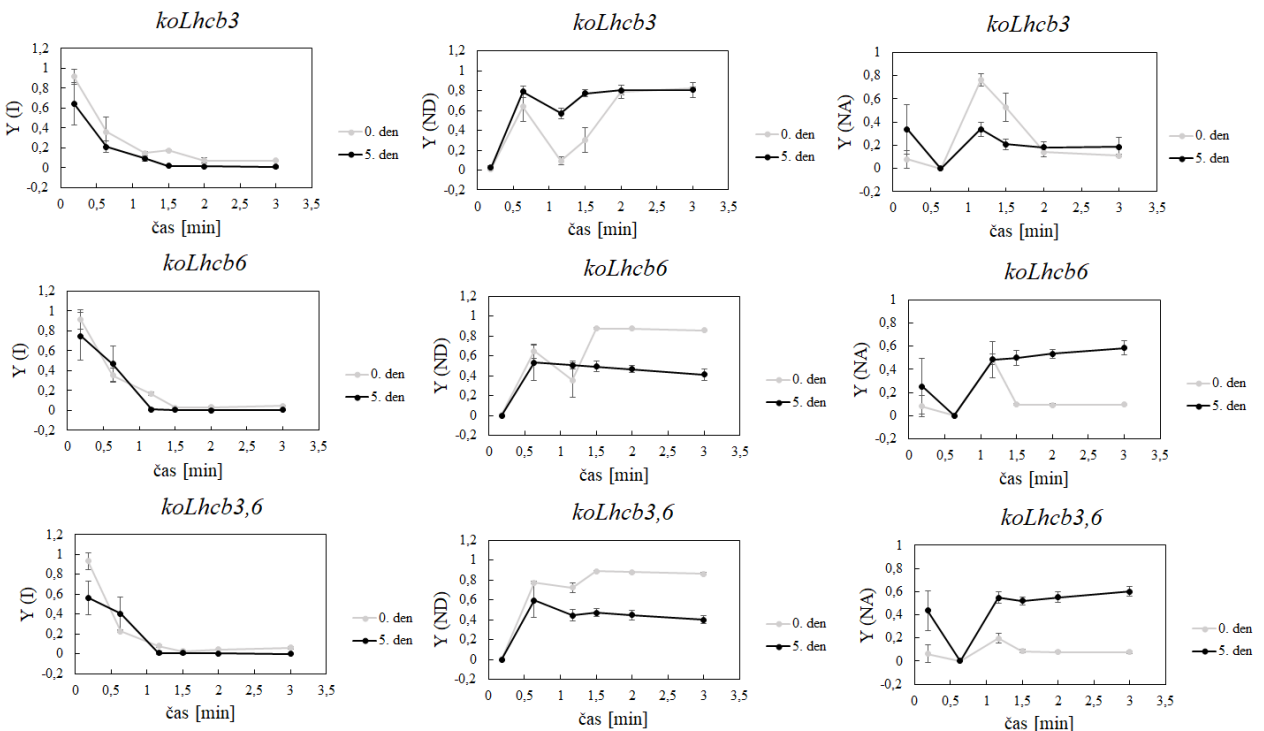
Průběh parametru Y(ND) obsahoval 0. i 5. den dvě minima a dvě maxima. První minimum bylo na počátku křivky a rovnalo se u většiny genotypů 0. i 5. den 0. U genotypu Penta byla 5. den první minimální hodnota asi 0,6. Následoval nárůst hodnot až do prvního maxima, které se 0. den pohybovalo u genotypů *koLhcb3*, *koLhcb6* a *koLhcb5* okolo 0,6, u zbylých genotypů pak kolem 0,8. Pátý den byly hodnoty prvních maxim variabilní: u WT, *koLhcb5* a Penty kolem 0,7; u *koPsbS*, *koLhcb6*, *koLhcb3,6* a *koLhcb4* okolo 0,6; u *koLhcb5,6* a *koLhcb3* asi 0,8 a u NoM téměř 1. Po prvním maximu došlo k postupnému poklesu na druhé minimum, které se 0. den u většiny genotypů pohybovalo mezi 0–0,2. U genotypu *koLhcb6* byla naměřena hodnota přibližně 0,4 a u genotypu *koLhcb3,6* dokonce 0,7 (téměř nedošlo k poklesu). Pátý den se minima držela u všech genotypů spíše na vyšších hodnotách, které byly opět variabilní: u WT přibližně 0,5; u *koPsbS*, *koLhcb5,6* a *koLhcb3,6* 0,4; u *koLhcb3*, *koLhcb6* a NoM 0,6; u *koLhcb4*, *koLhcb5* a Penta 0,2. Po druhém minimu následoval opět nárůst Y(ND). Druhého maxima bylo většinou dosaženo ve 3. (poslední) minutě měření, přičemž jeho hodnota se rovnala hodnotě prvního maxima.

Průběh parametru Y(NA) se zpravidla 0. i 5. den vyznačoval jedním výrazným maximem. Nultý den se toto maximum u většiny genotypů pohybovalo v rozmezí hodnot 0,6–0,8, u genotypu *koLhcb6* okolo 0,4 a u *koLhcb3,6* zhruba 0,2. Pátý den byly hodnoty maxima ve srovnání s 0. dnem nižší: u WT, *koLhcb3* a NoM 0,4; u *koPsbS*, *koLhcb5,6* asi 0,5; u *koLhcb4*, *koLhcb5* a Penta 0,6. Specifický průběh vykazovaly 5. den genotypy *koLhcb6* a *koLhcb3,6*, kdy bylo maxima dosaženo až na konci křivky (u obou genotypů hodnota 0,6) (Obr. 54, 55, 56).

Výše popsané změny parametrů Y(ND) a Y(NA) znamenají, že u listů většiny genotypů docházelo po 5 dnech ve tmě k přechodnému zvýšení nefotochemické disipace v důsledku limitace na donorové straně PSI a přechodnému snížení disipace v důsledku limitace na akceptorové straně PSI (přibližně v čase 0,5–1,5 min po spuštění aktinického světla). V případě genotypu Penta zmíněné změny nastávaly v pozdějším čase (1,5–2 min). U genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* byla naopak oproti 0. dni disipace v důsledku limitace na donorové straně PSI nižší a v důsledku limitace na akceptorové straně vyšší po téměř celou dobu měření.

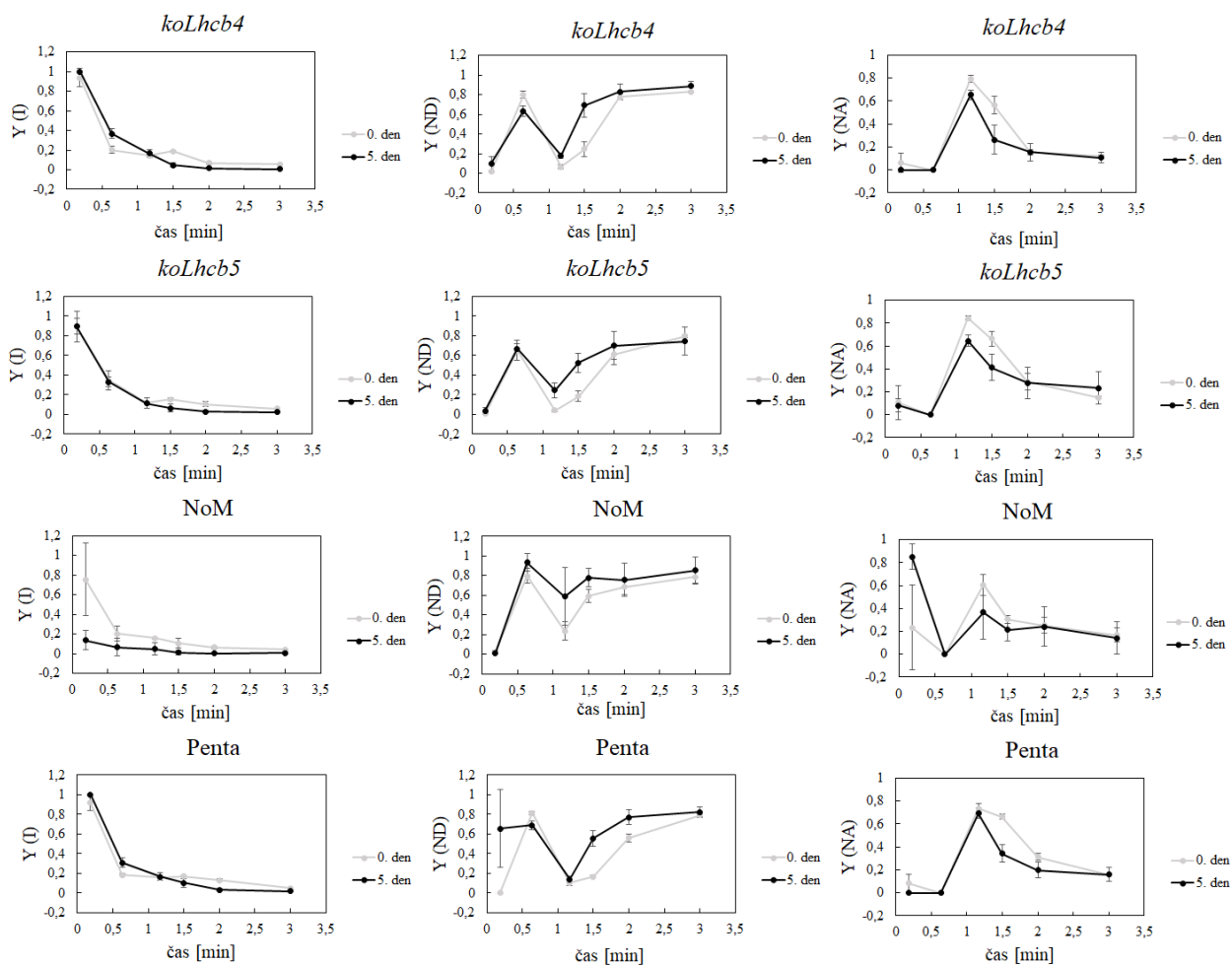


Obr. 54: Parametry Y(I), Y(ND) a Y(NA) naměřené v oddělených listech genotypů WT, *koPsbS* a *koLhcb5,6* rostlin *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Měření trvalo 3 minuty a probíhalo při spuštěném aktinickém světle ( $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Uvedeny průměry a SD,  $n = 5$ .



Obr. 55: Parametry Y(I), Y(ND) a Y(NA) naměřené v oddělených listech genotypů *koLhcb3*, *koLhcb6* a *koLhcb3,6* rostlin *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Měření trvalo 3 minuty a probíhalo při spuštěném aktinickém světle ( $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Uvedeny průměry a SD,  $n = 5$ .





Obr. 56: Parametry Y(I), Y(ND) a Y(NA) naměřené v oddělených listech genotypů *koLhcb4*, *koLhcb5*, NoM a Penta rostlin *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě. Měření trvalo 3 minuty a probíhalo při spuštěném aktinickém světle ( $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Uvedeny průměry a SD,  $n = 5$ .

#### 4.4 Srovnání změn vybraných parametrů u genotypů WT, *koLhcb6* a *koLhcb3,6*

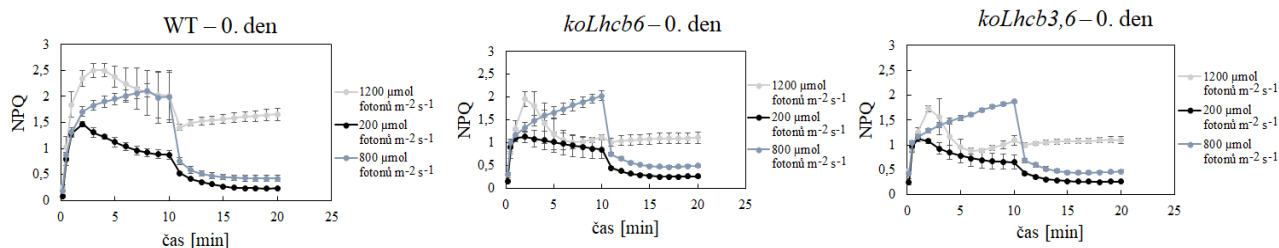
Z výše uvedených výsledků vyplývá, že v rámci genotypů, které měly srovnatelné parametry odrážející funkci PSII v právě oddělených listech (tedy kromě *koPsbS* a NoM), byly ve všech třech experimentech změny parametrů při senescenci indukované oddělením a zatměním listů nejvýrazněji odlišné (od WT) u genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6*. V následující části práce jsou tedy srovnány vybrané parametry genotypů WT, *koLhcb6* a *koLhcb3,6* naměřené v rámci všech tří experimentů.

##### 4.4.1 Parametr NPQ

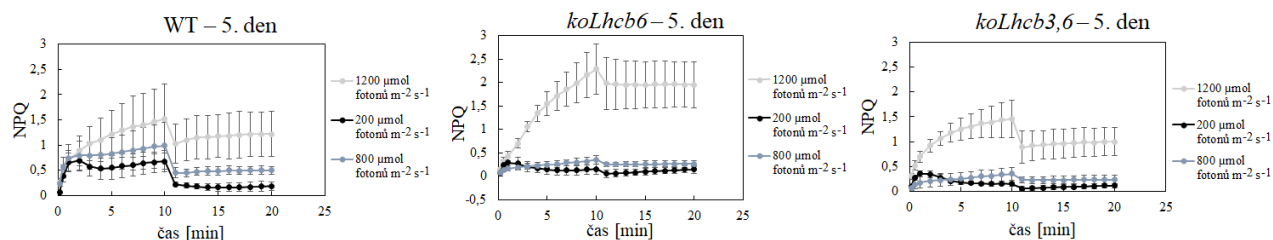
Obrázky 57 až 60 znázorňují průběh parametru NPQ v čase indukce na aktinickém světle a relaxace po jeho vypnutí u genotypů WT, *koLhcb6* a *koLhcb3,6* měřený při různých intenzitách světla (200, 800 a 1200  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

V případě právě oddělených listů (0. den, Obr. 57) rostlin WT se s nárůstem intenzity aktinického světla měnil průběh NPQ následovně: při nejnižší intenzitě (200  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) došlo k relativně rychlému nárůstu NPQ do maxima (cca 1–1,5), poté NPQ kleslo a po vypnutí světla nastalo snížení na hodnotu blízkou hodnotě výchozí. Při střední intenzitě světla (800  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) vymizel pokles NPQ v rámci indukce, NPQ dosáhlo vyššího maxima (okolo 2) v pozdějším čase a po vypnutí světla NPQ kleslo na mírně vyšší hodnoty (kolem 0,5) ve srovnání s nízkou intenzitou světla (přibližně 0,25). U nejvyšší použité intenzity aktinického světla (1200  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) byl nárůst NPQ nejvyšší (až 2,5), následoval mírný pokles a po vypnutí se hodnota NPQ držela na relativně vysoké úrovni (kolem 1,5–2,3). S rostoucí intenzitou aktinického světla bylo tedy více aktivováno nefotochemické zhášení, přičemž u nejvyšší intenzity už pravděpodobně došlo k výraznému nárůstu jeho fotoinhibiční složky. U genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* byl průběh NPQ podobný jako u WT, celkově byly ale hodnoty NPQ nižší, a to zejména u vysoké intenzity světla (Obr. 59).

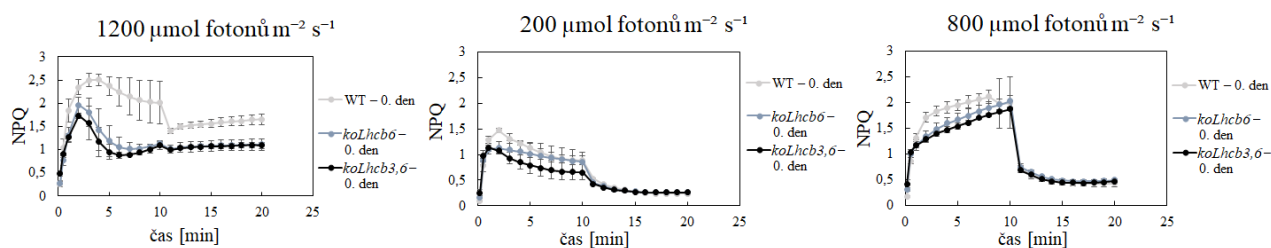
Pátý den po oddělení listů WT rostlin došlo k výraznému poklesu NPQ při použití všech intenzit aktinického světla (Obr. 58). U genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* byly hodnoty NPQ u nízké a střední intenzity světla velmi nízké, což odráží horší fungování PSII a nefotochemických procesů ve srovnání s WT (Obr. 60). Při vysoké intenzitě aktinického světla byly hodnoty NPQ u *koLhcb3,6* podobné jako u WT, zatímco u *koLhcb6* byly zvýšené.



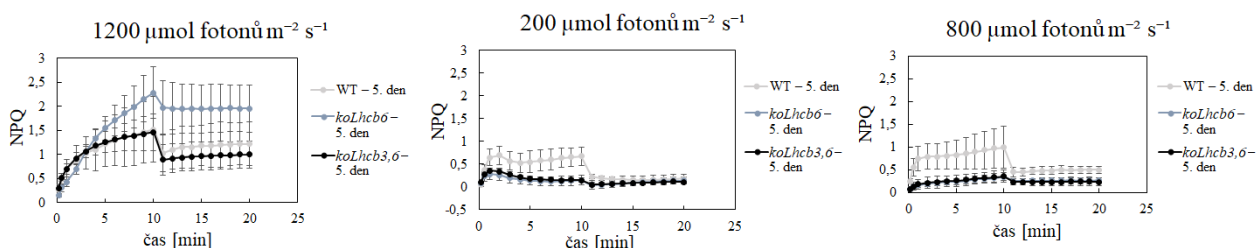
Obr. 57: Parametr NPQ naměřený v oddělených listech genotypů WT, *koLhcb6* a *koLhcb3,6* rostlin *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) po oddělení, kdy prvních 10 minut bylo měřeno při aktinickém světle o intenzitách 1200, 200 a 800  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , následujících 10 minut po vypnutí aktinického světla. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .



Obr. 58: Parametr NPQ naměřený v oddělených listech genotypů WT, *koLhcb6* a *koLhcb3,6* rostlin *A. thaliana* L. 5. den po inkubaci ve tmě, kdy prvních 10 minut bylo měřeno při aktinickém světle o intenzitách 1200, 200 a 800  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , následujících 10 minut po vypnutí aktinického světla. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .



Obr. 59: Parametr NPQ naměřený v oddělených listech genotypů WT, *koLhcb6* a *koLhcb3,6* rostlin *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) po oddělení, kdy prvních 10 minut bylo měřeno při aktinickém světle o intenzitách 200, 800 a 1200  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , následujících 10 minut po vypnutí aktinického světla. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .

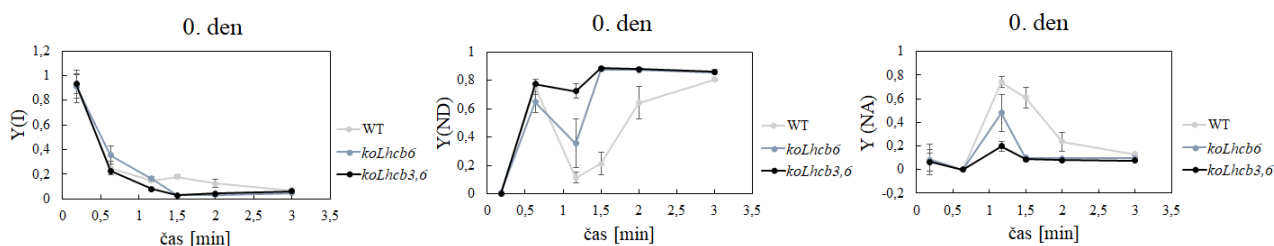


Obr. 60: Parametr NPQ naměřený v oddělených listech genotypů WT, *koLhcb6* a *koLhcb3,6* rostlin *A. thaliana* L. 5. den po inkubaci ve tmě, kdy prvních 10 minut bylo měřeno při aktinickém světle o intenzitách 200, 800 a 1200  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , následujících 10 minut po vypnutí aktinického světla. Uvedeny průměry a SD,  $n = 6$ .

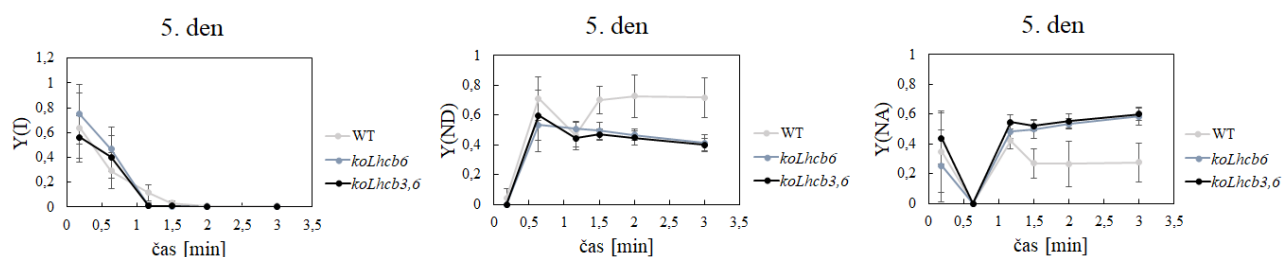
#### 4.4.2 Parametry Y(I), Y(ND) a Y(NA)

Průběhy parametru Y(I) vykazovaly 0. den u všech genotypů postupný pokles z maximální hodnoty k 0 (Obr. 61). Pátý den došlo ke snížení počátečních hodnot: u WT a *koLhcb3,6* na cca 0,6 a u *koLhcb6* na 0,75 (Obr. 62). Nejvýraznější rozdíly mezi genotypy byly nalezeny u kvantových výtěžků nefotochemické disipace energie – Y(ND) a Y(NA), a to jak 0. den, tak 5. den. U právě oddělených listů (0. den) bylo u genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* potlačeno přechodné snížení Y(ND) a přechodné zvýšení Y(NA) (Obr. 61), přičemž tento efekt byl výraznější u genotypu *koLhcb3,6*. Oproti WT tedy u uvedených genotypů došlo v průběhu 3 min po spuštění aktinického světla k vyšší limitaci na donorové straně PSI a zároveň k nižší limitaci na akceptorové straně PSI.

Pátý den po zatemnění oddělených listů byla u genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* situace opačná, tj. limitace na donorové straně byla menší a limitace na akceptorové straně větší ve srovnání s WT (Obr. 62).



Obr. 61: Parametry Y(I), Y(ND) a Y(NA) naměřené v oddělených listech genotypů WT, *koLhcb6* a *koLhcb3,6* rostlin *A. thaliana* L. bezprostředně (0. den) po oddělení, kdy měření trvalo 3 minuty a probíhalo při spuštěném aktinickém světle ( $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Uvedeny průměry a SD,  $n = 5$ .



Obr. 62: Parametry Y(I), Y(ND) a Y(NA) naměřené v oddělených listech genotypů WT, *koLhcb6* a *koLhcb3,6* 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě, kdy měření trvalo 3 minuty a probíhalo při spuštěném aktinickém světle ( $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Uvedeny průměry a SD,  $n = 5$ .

## 5 DISKUZE

Během senescence dochází typicky k poklesu obsahu chlorofylu a ke změnám parametrů chlorofylové fluorescence jako je např. pokles maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II ve stavu adaptovaném na tmu ( $F_V/F_M$ ) vyjadřujícího funkčnost PSII nebo také pokles efektivního kvantového výtěžku fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na světlo ( $\Phi_P$ ) odrážejícího množství absorbované energie, jež je využita během fotosyntézy. Nefotochemické zhášení (NPQ) chrání rostliny před případným fotooxidačním poškozením z nadbytku světlené energie a je tvořeno 3 základními složkami, které se od sebe liší rychlostí relaxace při umístění rostliny do tmy po předchozím vystavení světlu:  $q_E$  (zhášení závislé na energii) relaxuje v průběhu sekund až několik jednotek minut,  $q_T$  (zhášení závislé na stavových přechodech) relaxuje během desítek minut a  $q_I$  (fotoinhibiční zhášení) relaxuje i několik hodin. NPQ vyjadřující míru disipace absorbované energie na teplo v průběhu senescence zpočátku narůstá a později klesá. Parametr  $1 - q_P$  nazývaný jako excitační tlak na PSII představuje část reakčních center PSII, která jsou uzavřena (jinak se dá definovat jako množství redukováných  $Q_A$ ) a během senescence narůstá (Maxwell a Johnson 2000, Müller a kol. 2001, Roháček 2002, Vlčková a kol. 2006, Dai a kol. 2014, Derks a kol. 2015). Senescenci ovlivňuje řada faktorů, z nichž jedním je světlo. Senescence může být indukována světlem vysoké intenzity nebo zatemněním. Naopak ji dokáže zpomalit světlo mírné až střední intenzity (přibližně do 100  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Kar a kol. 1993).

Míra a pořadí degradace LHC a dalších komponent fotosyntetického aparátu závisí na podmínkách senescence a rostlinném druhu, přičemž mechanismus této degradace doposud nebyl objasněn. Rychlost, míra a pořadí degradace světlosběrných komplexů mohou být důležité z hlediska potřeby zachování nízkého poškození chloroplastů a buněk za účelem efektivní recyklace látek během senescence. Je také známo, že mutantní rostliny s deficiencí některých LHC mají ovlivněnou organizaci, funkci a stabilitu fotosyntetického aparátu, nicméně jejich senescence dosud nebyla popsána. Proto bylo cílem této diplomové práce porovnat průběh senescence u vybraných mutantů *A. thaliana* a posoudit vliv deficiencie jednotlivých LHC a PsbS proteinu. Sledovány byly vybrané parametry chlorofylové fluorescence ( $F_0$ ,  $F_M$ ,  $F_V/F_M$ , NPQ a  $1 - q_P$ ), obsah fotosyntetických pigmentů (součet chlorofylu  $a + b$ , poměr chlorofylu  $a/b$ , obsah karotenoidů) a během experimentu 3 oxidace P700, a to vždy 0. a 5. den po oddělení a inkubaci ve tmě/na světle u oddělených, popř. individuálně zatemněných listů.

Při posuzování fenotypu rostlin jednotlivých genotypů byla u *koLhcb6* a *koLhcb3,6* pozorována mírná a u NoM poměrně výrazná redukce růstu ve srovnání se standardním genotypem WT. Tato pozorování byla v souladu se zjištěními v pracích Ilíková a kol. (2021) a Dall'Osto a kol. (2014). Ostatní genotypy nevykazovaly ve srovnání s WT změny ve velikosti jejich nadzemních částí. U všech genotypů došlo po inkubaci oddělených listů 5 dnů na světle ( $90 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) k akumulaci antokyanů, které mají úlohu optického filtru a chrání buňky listů před fotooxidačním poškozením (Elgimabi 2017).

Spektrofotometrická analýza ukázala 5. den po inkubaci oddělených listů ve tmě i u IDL pokles součtu obsahu chlorofylu  $a + b$  u všech genotypů o průměrně 61 % (na cca 6 z  $15,5 \mu\text{g/cm}^2$ ). Zpravidla nejvyšší hodnoty byly pozorovány u *koPsbS*, naopak nejnižší u *koLhcb3,6*. U oddělených listů inkubovaných 5 dnů na světle došlo k poklesu chl  $a + b$  o přibližně 30 % (ze 17 na  $12 \mu\text{g/cm}^2$ ). Snížení obsahu chlorofylů pozorovali např. i Špundová a kol. (2005a) po inkubaci rostlin pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) 6 a 12 dnů ve tmě. Také Špundová a kol. (2005b) pozorovali u listů ječmene (*Hordeum vulgare* L.) inkubovaných 6 dnů ve tmě (chl  $a + b = 6 \mu\text{g/cm}^2$ , kontrola byla cca  $23 \mu\text{g/cm}^2$ ) rychlejší degradaci chlorofylů než u listů inkubovaných 6 dnů na kontinuálním světle o intenzitě  $90 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (chl  $a + b = 18 \mu\text{g/cm}^2$ ).

Hodnoty poměru obsahu chlorofylu  $a/b$  vykazovaly ve srovnání s 0. dnem u všech genotypů inkubovaných 5 dnů ve tmě nárůst o přibližně 50 %. V rámci všech experimentů byl pozorován nejvyšší nárůst tohoto poměru u genotypů *koLhcb5*, *koLhcb5,6* a Penta, naopak poměrně malý nárůst nastal u *koLhcb6* a *koLhcb3,6*. Vyšší hodnoty tohoto parametru znamenají, že u listů inkubovaných ve tmě docházelo rychleji k degradaci chlorofylu  $b$  a tedy i světlosběrných komplexů, než chlorofylu  $a$ , který se nachází i v reakčních centrech (např. Špundová a kol. 2003). U listů inkubovaných 5 dnů na světle došlo naopak k poklesu chl  $a/b$  o cca 20 %, což značí rychlejší degradaci reakčních center v porovnání s LHC. Obsah karotenoidů (car) byl ve srovnání s kontrolou snížen u genotypů inkubovaných ve tmě průměrně o 50 % (nejnižší hodnoty u *koLhcb3,6*), u listů inkubovaných na světle došlo ke snížení o cca 35 %. Ve srovnání s chlorofyly však karotenoidy degradovaly během indukované senescence pomaleji, což je v souladu s literaturou – např. Biswal (1995).

Funkce fotosyntetického aparátu byla posuzována na základě měření fluorescenčních parametrů. Parametr  $F_v/F_m$  se během všech experimentů a u většiny genotypů pohyboval 0. den okolo hodnoty 0,83, což je typická hodnota pro dospělé, plně funkční zdravé listy. U genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* byl pozorován mírně nižší poměr  $F_v/F_m$  (okolo 0,75) a u genotypu NoM byl tento poměr výrazně nižší (okolo 0,5). Snížené hodnoty parametru  $F_v/F_m$  pozorovali u

genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* také Ilíková a kol. (2021), což je podle nich dáno zvýšením  $F_0$  a snížením  $F_M$ . Při analýze genotypu NoM zaznamenali Dall'Osto a kol. (2017) taktéž sníženou hodnotu parametru  $F_V/F_M$  – okolo 0,57. Pátý den po inkubaci listů ve tmě došlo u všech genotypů k poklesu hodnot  $F_V/F_M$ . V rámci experimentů 1 (oddělené listy i IDL) a 3 byly u většiny genotypů naměřeny nižší hodnoty (průměrně 0,5) než během experimentu 2 (okolo 0,6). Ve srovnání se standardním genotypem WT vykazovaly všechny genotypy s deficiencí vybraných světlosběrných komplexů po indukci senescence zatemněním větší či menší zhoršení funkčnosti PSII. Nejnížší hodnoty byly během všech experimentů získány u genotypů *koLhcb6*, *koLhcb3,6* a NoM. V experimentu 2 došlo během 5. dne po inkubaci listů na světle ( $60 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ve srovnání s 0. dnem k minimálnímu poklesu, u genotypu NoM pak byly naměřené hodnoty výrazně nižší. Nízké hodnoty  $F_V/F_M$  byly však u genotypu NoM naměřeny i 0. den a byla u něj pozorována i celková redukce růstu.

Parametr  $F_0$  se během všech experimentů a u většiny genotypů pohyboval 0. den okolo stejné hodnoty, u genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* bylo hodnoty mírně vyšší, u genotypu NoM pak došlo k výraznému zvýšení. Za zvýšení hodnot  $F_0$  zřejmě zodpovídá funkční přerušení mezi světlosběrnými komplexy a jádrem PSII (Ilíková a kol. 2021). Pátý den po inkubaci listů ve tmě došlo během experimentů 1 a 3 ve srovnání s kontrolou u genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* ke zvýšení hodnot. To značí, že zřejmě došlo k dalšímu zhoršení funkčního propojení mezi LHC a reakčními centry PSII. U ostatních genotypů došlo 5. den po inkubaci ve tmě ve srovnání s 0. dnem ke snížení hodnot tohoto parametru. Pátý den po inkubaci listů na světle během experimentu 2 byly získané hodnoty srovnatelné s kontrolou (kromě genotypů *koLhcb6*, *koLhcb3,6* a NoM, kdy byly hodnoty nižší).

Parametr  $F_M$  se během všech experimentů pohyboval 0. den okolo podobných hodnot. Pátý den po inkubaci listů ve tmě došlo u všech genotypů k poklesu hodnot (až o 60 %). U parametru  $F_M$  nebyly pozorovány žádné větší rozdíly (až na pár odchylek) mezi jednotlivými genotypy. Příčinou poklesu  $F_M$  mohl být rychlý úbytek chlorofylů nebo zvýšená aktivita nefotochemických zhášecích procesů (Vlčková a kol. 2006).

Během experimentů 1 a 3 byly pozorovány v první polovině průběhu měření (0. i 5. den) velmi nízké hodnoty parametru  $\Phi_P$  (blížíci se 0), a to z důvodu použití relativně vysokého aktinického světla během měření (v experimentu 1 asi 12krát a v experimentu 3 přibližně 8krát vyššího než pěstební světlo), abychom zjistili, jak mutantní genotypy reagují na světlo vysoké intenzity. V rámci experimentu 2, kdy bylo použito aktinické světlo o intenzitě  $200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , byly v první polovině průběhu měření pozorovány vyšší hodnoty parametru  $\Phi_P$  než v experimentech 1 a 3 (u vzorků inkubovaných 5 dnů na světle asi 6krát vyšší než u vzorků

inkubovaných ve tmě). Po vypnutí aktinického světla (druhá část průběhu) došlo k nárůstu tohoto parametru k hodnotám okolo 0,8 (během experimentu 1 k polovičním hodnotám). Hodnoty  $\Phi_P$  byly během fluorescenční indukce obecně u všech genotypů, které byly inkubovány 5 dnů ve tmě, ve srovnání s 0. dnem sníženy. Nejvyšší snížení bylo zpravidla pozorováno u genotypů *koLhcb6*, *koLhcb3,6* a NoM, což indikuje, že v těchto genotypech docházelo k největšímu poklesu využívání absorbované energie během fotosyntézy.

Parametr NPQ vykazoval během všech experimentů u většiny genotypů inkubovaných 5 dnů ve tmě ve srovnání s kontrolou pomalejší a nižší nárůst a poté i mírnější a pomalejší pokles (obzvlášť během experimentu 1, kdy bylo použito světlo intenzity  $1200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), což značí, že v první fázi došlo k pomalejší aktivaci ochranných zhášecích procesů a v druhé fázi došlo k pomalejšímu útlumu těchto procesů. Za pomalejší pokles hodnot v druhé části průběhu NPQ je pravděpodobně zodpovědný zvýšený podíl pomalu relaxující složky qI značící fotoinhibiční poškození způsobené vysokou intenzitou světla (Malnoë 2018). Nejhůře na tom byly v rámci experimentů, co se týče využití NPQ při ozáření rostliny světlem, genotypy *koLhcb6*, *koLhcb3,6* a NoM, což odpovídalo i míře poklesu hodnot  $F_V/F_M$ . U těchto genotypů byl zhoršený stav již ve tmě a vystavení aktinickému světlu (obzvlášť vysoké intenzity – experiment 1 a 3) tento stav dále zhoršilo. Během experimentu 3 byl u genotypu NoM pozorován dvoufázový nárůst NPQ. Tento jev zaznamenali i Townsend a kol. (2018), podle nichž je první fáze nárůstu závislá na přítomnosti PsbS proteinu, za ustálení až mírný pokles odpovídá odpojení LHC od jaderného komplexu, druhá fáze nárůstu pak zřejmě souvisí s aktivací xantofylového cyklu. Za zmínku stojí také průběh tohoto parametru pro genotyp PsbS (na proteinu PsbS je přímo závislá složka NPQ qE), kdy byla pozorována velice pomalá aktivace i relaxace zhášení (0. i 5. den). Toto pozorování je v souladu s předcházející studií Li a kol. (2000). Obecně byla nejvyšší aktivita zhášecích procesů pozorována během experimentu 1. kdy bylo při měření použito světlo intenzity  $1200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , poté během experimentu 3 ( $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a nakonec v rámci experimentu 2 ( $200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Průběh NPQ u listů inkubovaných na světle během experimentu 2 byl podobný průběhu u listů inkubovaných ve tmě.

Během experimentu 1 se hodnoty parametru  $1 - q_P$  při zapnutém aktinickém světle pohybovaly u všech genotypů 0. i 5. den okolo 1, což odráží maximálně redukovaný PQ pool v důsledku použití vysoké intenzity světla. Po vypnutí aktinického světla došlo k poklesu hodnot. Během experimentu 2 hodnoty parametru  $1 - q_P$  při zapnutém aktinickém světle u všech genotypů 0. i 5. den postupně klesaly – nejméně u listů inkubovaných ve tmě (větší redukce PQ poolu ve srovnání s 0. dnem) a nejvíce u listů inkubovaných na světle (menší redukce PQ poolu



ve srovnání s kontrolou). Po vypnutí aktinického světlo došlo k poklesu na 0. Během experimentu 3 se hodnoty parametru  $1 - qP$  při zapnutém aktinickém světle pohybovaly u všech genotypů 0. i 5. den okolo 1 a po vypnutí aktinického světlo došlo k poklesu na 0 (u genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* se hodnoty držely nad 0). Průběhy tohoto parametru u jednotlivých genotypů byly pro 0. i 5. den téměř totožné. Nebyly pozorovány větší rozdíly mezi genotypy navzájem.

U IDL byly změny sledovaných parametrů kvalitativně podobné jako u oddělených zatemněných listů, kvantitativně však byly změny odlišné. U IDL byl ve srovnání s oddělenými listy inkubovanými ve tmě pozorován větší pokles  $F_V/F_M$  (horší funkce PSII), zpravidla nárůst  $F_0$  (pravděpodobně prohloubení procesu odpojování světloběrných antén od jaderného komplexu) a u parametru  $F_M$  byly hodnoty podobné. Průběhy  $\Phi_P$  a  $1 - qP$  byly při zapnutém aktinickém světle taktéž podobné (kvalitativně i kvantitativně) průběhům oddělených listů. U NPQ byly naměřeny nižší hodnoty ve srovnání s hodnotami oddělených listů, došlo tedy ke snížení disipace přebytečné absorbované energie ve formě tepla, což může indikovat také větší poškození PSII. U IDL došlo ve srovnání s oddělenými listy k rychlejší senescenci, nicméně kvalitativně byly změny probíhající během senescence u IDL podobné změnám u oddělených listů. Proto se i oddělené listy dají použít jako (jednodušší) model senescence indukované zatemněním.

V rámci experimentu 3 byly měřeny parametry sloužící k posouzení funkce PSI. Průběhy parametru  $Y(I)$  vykazovaly 0. den u většiny genotypů postupný pokles z hodnoty 1 k 0, kdy na počátku přijímá P700 excitační energii, která je efektivně využita k fotochemii, postupně je však aktivován i PSII a PSI se uzavírá, hodnoty klesají k 0. Pátý den došlo u některých genotypů ke snížení počátečních hodnot, což značí, že došlo k limitaci na donorové nebo akceptorové straně.

Průběh parametru  $Y(ND)$  vykazoval 0. i 5. den dvě fáze nárůstu, jejichž maximální hodnoty byly podobné. Rozdílné byly mezi genotypy hodnoty poklesu mezi fázemi nárůstu (0. den většinou okolo 0, u genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* výrazně vyšší, 5. den byly hodnoty různé a spíše vyšší). Vyšší hodnoty (v části průběhu, kde by měl být pozorován pokles) znamenají zpomalení toku elektronů do PSI, jeho přerušování nebo poškození PSII.

Průběh parametru  $Y(NA)$  se zpravidla 0. i 5. den vyznačoval jedním výrazným maximem. Nultý den se toto maximum u většiny genotypů pohybovalo okolo stejných hodnot (0,7), u genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* byly hodnoty maxima výrazně sníženy. Pátý den byly hodnoty maxima ve srovnání s 0. dnem nižší (snížení na polovinu). Přisunem elektronů z PSII dochází postupně k přesycení PSI a akceptorů (nárůst a maximum), tok elektronů je tak

přerušen a dochází k poklesu hodnot. Nižší hodnoty během průběhu nárůstu znamenají zpomalení nebo omezení toku elektronů do PSI nebo poškození PSII. Jestliže nedochází po nárůstu hodnot k následovnému poklesu, je omezen tok elektronů na akceptorové straně za PSI (limitace na akceptorové straně). Tento průběh byl pozorován zejména u genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6* inkubovaných 5 dnů ve tmě.

## 6 ZÁVĚR

Senescence je poslední vývojová fáze rostliny nebo listu. Je doprovázena recyklací jednoduchých živin ze senescentních listů do jiných částí rostliny. Následkem rozpadu chloroplastů, chlorofylu a dalších důležitých makromolekul včetně světloběrných (LHC) komplexů, dochází k inhibici fotosyntézy. Mechanismus degradace LHC nebyl doposud objasněn. Je známo, že mutantní rostliny s deficiencí některých LHC mají ovlivněnou organizaci, funkci a stabilitu fotosyntetického aparátu, nicméně jejich senescence dosud nebyla popsána.

Cílem této diplomové práce bylo porovnat průběh senescence u vybraných mutantů *Arabidopsis thaliana* a posoudit vliv deficience jednotlivých LHC a PsbS proteinu. Sledovány byly některé parametry chlorofylové fluorescence, obsah fotosyntetických pigmentů a během experimentu 3 oxidace P700, a to vždy 0. a 5. den po oddělení a inkubaci ve tmě/na světle u oddělených, popř. individuálně zatemněných listů.

Během senescence indukované zatemněním došlo u standardního genotypu (WT) ve srovnání s čerstvě oddělenými listy k poklesu obsahu fotosyntetických pigmentů a k nárůstu poměru chlorofylu *a/b*, což indikuje rychlejší degradaci světloběrných komplexů oproti reakčním centrům. Dále byl zaznamenán pokles funkce PSII a snížení využití energie ve fotochemii. Vzhledem ke snížení hodnot  $F_0$  během senescence zřejmě nedošlo k odpojení LHC od jaderného komplexu. Nefotochemické zhášení bylo nejvíce aktivováno při použití aktinického světla nejvyšší intenzity. Během senescence bylo fungování nefotochemických procesů zhoršeno. Funkce PSI byla ve srovnání s 0. dnem mírně zhoršena.

Genotyp *koPsbS* byl fenotypově k nerozeznání od standardního genotypu. Obsah fotosyntetických pigmentů nebyl ve srovnání s ostatními genotypy snížen. Funkčnost PSII byla během 0. dne srovnatelná s plně funkčními zdravými listy. Během senescence indukované zatemněním došlo, jako u všech genotypů, k poklesu funkce PSII a ke snížení využití energie ve fotochemii. Stejně jako u WT nebylo zaznamenáno odpojení LHC od jaderného komplexu. Specifický byl průběh nefotochemického zhášení, kdy byla pozorována ve srovnání s ostatními genotypy pomalá aktivace i relaxace zhášení, což se dá vysvětlit tím, že vlivem deficience proteinu PsbS nemohlo dojít k aktivaci složky nefotochemického zhášení qE. Funkce PSI byla i během senescence zachována (ve srovnání s WT byla funkce PSI v senescentních listech lepší).

Ve srovnání s WT nebyly u *koLhcb3* pozorovány rozdíly v rychlosti růstu či obsahu fotosyntetických pigmentů. Funkce PSII a PSI nebyla nijak ovlivněna. Tento mutantní genotyp

vykazoval za normálních podmínek i během senescence prakticky stejné vlastnosti jako WT. Nepřítomnost Lhcb3 je totiž pravděpodobně kompenzována zvýšeným výskytem podjednotek Lhcb1 a Lhcb2.

Genotypy *koLhcb5,6*, *koLhcb4*, *koLhcb5* a Penta vykazovaly zpravidla velmi podobné vlastnosti. Dosahovaly stejného vzrůstu jako standardní genotyp. Obsah fotosyntetických pigmentů byl čerstvě po oddělení i během senescence podobný obsahu pigmentů u ostatních genotypů. PSII byl u právě oddělených listů funkční jako u dospělých, zdravých listů WT. Během senescence indukované zatemněním došlo ve srovnání s WT k mírně vyššímu poklesu funkce PSII a ke znatelnějšímu snížení využití energie ve fotochemii. U genotypů *koLhcb5,6* a Penta výsledky v některých případech naznačovaly funkční přerušování mezi LHC a jaderným komplexem během senescence. Během senescence bylo fungování nefotochemických procesů zhoršeno podobně jako u WT. Funkce PSI byla během senescence, podobně jako u WT, mírně zhoršena. Deficience světlosběrných komplexů Lhcb4, Lhcb5 a Lhcb5 s Lhcb6 tedy nepůsobila na průběh listové senescence. Překvapením byl dobrý stav genotypu Penta, kde chybí dokonce 5 různých Lhcb proteinů, včetně Lhcb3 a Lhcb6, jejichž společná deficience stimulovala pokles funkčnosti fotosyntetického aparátu v senescentních listech (viz dále). Zachovaný vzrůst rostlin a dobrá funkčnost fotosystémů mohla být u těchto mutantních genotypů dána akumulací jiných Lhcb podjednotek.

Při posuzování fenotypu rostlin jednotlivých genotypů byla u *koLhcb6* a *koLhcb3,6* pozorována mírná redukce růstu ve srovnání s WT. Obsah fotosyntetických pigmentů nebyl ve srovnání s ostatními genotypy snížen. Funkčnost PSII byla u těchto genotypů během 0. dne srovnatelná s plně funkčními zdravými listy WT, nicméně mírně vyšší hodnoty  $F_0$  indikovaly zhoršený přenos excitací z LHC do reakčních center PSII, což už bylo u těchto genotypů popsáno v literatuře. Pátý den po inkubaci listů ve tmě došlo k výraznějšímu poklesu funkce PSII ve srovnání s WT. Oproti 0. dni bylo zaznamenáno další zhoršení funkčního propojení mezi LHC (pravděpodobně M trimery) a reakčními centry PSII. Vzhledem k tomu, že poměr chlorofylu *a/b* během senescence v listech *koLhcb6* a *koLhcb3,6* nenarostl více než u ostatních genotypů, je pravděpodobné, že předpokládané větší zastoupení volných M trimerů nezpůsobilo urychlení degradace LHC.

Hodnoty nefotochemického zhášení byly u nízké a střední intenzity světla velmi nízké, což také odráží horší fungování PSII a nefotochemických procesů ve srovnání s WT. Omezená byla také funkce PSI, kdy byla během senescence zaznamenána limitace na jeho akceptorové straně, což znamená zpomalení nebo omezení toku elektronů z PSI. Deficience podjednotek Lhcb3 s Lhcb6 a Lhcb6 tedy ovlivnila funkci PSII, a to obzvláště během senescence. Vzhledem

k tomu, že u těchto genotypů nedošlo ve srovnání s ostatními genotypy k výraznějšímu poklesu fotosyntetických pigmentů, není primární příčinou horší funkce PSII vyšší míra degradace, ale pravděpodobně změna organizace v rámci superkomplexu.

Genotyp NoM vykazoval ve srovnání s ostatními genotypy specifické vlastnosti. Zaznamenána byla poměrně výrazná redukce růstu. Obsah fotosyntetických pigmentů však nebyl ve srovnání s ostatními genotypy za normálních podmínek ani během senescence snížen. Funkčnost PSII byla u tohoto genotypu snížena již 0. den, pátý den po inkubaci listů ve tmě byl pokles funkce PSII ještě více prohlouben. Bylo zaznamenáno porušení funkčního spojení světlosběrných komplexů s jádry PSII, což bylo způsobeno absencí minoritních antén (Lhcb4.1, Lhcb4.2 a Lhcb5), jejichž funkcí je právě připojení M a S trimerů k jadernému komplexu. Hodnoty nefotochemického zhášení byly velmi nízké, což odráží horší fungování nefotochemických procesů a PSII ve srovnání s WT. Snížena byla také funkce PSI, kdy byla během senescence zaznamenána limitace na donorové straně, což znamená, že došlo ke zpomalení toku elektronů do PSI, jeho přerušení nebo poškození PSII. Deficience podjednotek Lhcb4.1, Lhcb4.2 a Lhcb5 výrazně ovlivnila fenotyp i funkci PSII, a to již za normálních podmínek. Vzhledem k tomu, že u tohoto genotypu nedošlo ve srovnání s ostatními genotypy k výraznějšímu poklesu fotosyntetických pigmentů, je pravděpodobnou příčinou výraznějšího zhoršení funkce PSII (stejně jako u genotypů *koLhcb6* a *koLhcb3,6*) změna organizace v rámci superkomplexu.

U IDL byly změny sledovaných parametrů kvalitativně podobné jako u oddělených zatemněných listů, kvantitativně však byly změny odlišné – horší funkce PSII, prohloubení procesu odpojování světlosběrných antén od jaderného komplexu a horší fungování nefotochemických procesů. U IDL došlo ve srovnání s oddělenými listy k mírně rychlejší senescenci, což by mohlo souviset s vlivem zbylé části rostliny, konkrétně se stimulací senescence listů, ve kterých z důvodu zatemnění neprobíhala senescence. Nicméně kvalitativně byly změny probíhající během senescence u IDL podobné změnám u oddělených listů. Proto se i oddělené listy dají použít jako (jednodušší) model senescence indukované zatemněním.

Při inkubaci oddělených listů na světle došlo u všech genotypů k akumulaci antokyanů, které chrání buňky listů před fotooxidačním poškozením. Změny obsahu fotosyntetických pigmentů a většiny sledovaných parametrů chlorofylové fluorescence byly kvalitativně podobné jako u listů inkubovaných ve tmě, ale méně výrazné. Vyšší hodnoty parametru  $\Phi_P$  a nižší hodnoty  $1 - q_P$  indikovaly dokonce mírně lepší fotochemii PSII i transport elektronů za PSII než u čerstvě oddělených listů. V našem případě tedy světlo oproti zatemnění zpomalilo změny indukované senescencí.

Obecným závěrem je, že deficiencie některých LHC (Lhcb4.1, Lhcb4.2 a Lhcb5 u NoM, Lhcb6 u *koLhcb6* a Lhcb3 s Lhcb6 u *koLhcb3,6*) urychluje pokles funkce PSII vyvolaný zatemněním listů. Vzhledem k tomu, že u příslušných genotypů nedošlo ve srovnání s ostatními genotypy k výraznějšímu poklesu obsahu fotosyntetických pigmentů, není primární příčinou snížení funkce PSII vyšší míra degradace, ale pravděpodobně změna organizace v rámci superkomplexu PSII.

Na základě získaných výsledků a pozorování je v nejbližší budoucnosti plánována strukturní analýza změn organizace superkomplexů PSII při senescenci (u WT i mutantních genotypů) a studium vlivu deficiencie vybraných světlosběrných komplexů a PsbS proteinu na průběh přirozené senescence.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- About Arabidopsis. The Arabidopsis information resource. <https://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>. Staženo 11.3. 2022.
- Adam Z., Clarke A.K. (2002). Cutting edge of chloroplast proteolysis. *Trends in Plant Science* **7**, 451–456.
- Amerongen H., Croce R. (2013). Light harvesting in photosystem II. *Photosynthesis Research* **116**, 251–263.
- Ali A., Gao X., Guo Y. (2018). Initiation, progression, and genetic manipulation of leaf senescence. *Methods in Molecular Biology* **1774**, 9–31.
- Ballottari M., Girardon J., Dall'Osto L., Bassi R. (2012). Evolution and functional properties of Photosystem II light harvesting complexes in eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* **1817**, 143–157.
- Barták M. (2011). Indikace dopadů stresu na vitalitu *in-vitro* kultivovaných rostlin pomocí pokročilých metod fluorescence chlorofylu. V: Rostlinné biotechnologie II – současné trendy ve výuce a výzkumu (Barták M., Hájek J., Dubová J., eds.). Masarykova univerzita Brno, 1–12.
- Biswal B. (1995). Carotenoid catabolism during leaf senescence and its control by light. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **30**, 3–13.
- Boekema, E. J., Semchonok, D.A. (2019). Organization of photosynthetic membrane proteins into supercomplexes. In: Light harvesting in photosynthesis (Croce, R., van Grondelle, R., van Stokkum, I.H.M., van Amerongen, H., eds.). CRC Press, Boca Raton, 207–217.
- Briggs W.R., Olney M.A. (2001). Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiology* **125**, 85–88.
- Caffarri S., Kouřil R., Kerešiče S., Boekema E.J., Croce R. (2009). Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *The European Molecular Biology Organization Journal* **28**, 3052–3063.
- Camp P.J., Huber S.C., Burke J.J., Moreland D.E. (1982). Biochemical changes that occur during senescence of wheat leaves: basis for the reduction of photosynthesis. *Plant Physiology* **70**, 1641–1646.
- Dai J., Gao H., Dai Y., Zou Q. (2004). Changes in activity of energy dissipating mechanisms in wheat flag leaves during senescence. *Plant Biology* **6**, 171–177.
- Dall'Osto, L., Caffarri, S., Bassi, R. (2005). A mechanism of nonphotochemical energy dissipation, independent from PsbS, revealed by a conformational change in the antenna protein CP26. *The Plant Cell* **17**, 1217–1232.

- Dall'Osto L., Ünlü C., Cazzaniga S., van Amerongen H. (2014). Disturbed excitation energy transfer in *Arabidopsis thaliana* mutants lacking minor antenna complexes of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* **1837**, 1981–1988.
- Dall'Osto L., Cazzaniga S., Bressan M., Paleček D., Židek K., Niyogi K., Fleming G., Zigmantas D., Bassi R. (2017). Two mechanisms for dissipation of excess light in monomeric and trimeric light-harvesting complexes. *Nature Plants* **3**, 17033.
- Damkjær J.T., Kerešiče S., Johnson M.P., Kovacs L., Kiss A.Z., Boekema E.J., Ruban A.V., Horton P., Jansson S. (2009). The photosystem II light-harvesting protein Lhcb3 affects the macrostructure of photosystem II and the rate of state transitions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 3245–3256.
- de Bianchi S., Dall'Osto L., Tognon G., Morosinotto T., Bassi R. (2008). Minor antenna proteins CP24 and CP26 affect the interactions between photosystem II subunits and the electron transport rate in grana membranes of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**, 1012–1028.
- de Bianchi S., Betterle N., Kouřil R., Cazzaniga S., Boekema E., Bassi R., Dall'Osto L. (2011). *Arabidopsis* mutants deleted in the light-harvesting protein Lhcb4 have a disrupted photosystem II macrostructure and are defective in photoprotection. *The Plant Cell* **23**, 2659–2679.
- Dekker J.P., Boekema E.J. (2005). Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* **1706**, 12–39.
- Derks A., Schaven K., Bruce D. (2015). Diverse mechanisms for photoprotection in photosynthesis. Dynamic regulation of photosystem II excitation in response to rapid environmental change. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* **1847**, 468–485.
- Dostálová D. (2020). Vplyv absencie svetlozberných komplexov Lhcb3 a Lhcb6 na nefotochemické zhášanie u mutantov *Arabidopsis thaliana*. Bakalárska práca. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Elgimabi M.E.N.E. (2017). Effect of light irradiance on regulation of leaf senescence. *Journal of Botanical Sciences* **6**, 5–13.
- Forsberg J., Ström J., Kieselbach T., Larsson H., Alexciev K., Engström A., Akerlund H.E. (2005). Protease activities in the chloroplast capable of cleaving an LHCI N-terminal peptide. *Physiologia Plantarum* **123**, 21–29.
- Gan S., Amasino R.M. (1997). Making sense of senescence (Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). *Plant Physiology* **113**, 313–319.
- Gan S. (2007). Mitotic senescence in plants. In: Senescence processes in plants (Gan S., ed.). Blackwell Publishing Oxford, 1–11.



- Goral T. K., Johnson M. P., Duffy C. D. P., Brain A. P. R., Ruban A. V. (2012). Light-harvesting antenna composition controls the macrostructure and dynamics of thylakoid membranes in Arabidopsis. *The Plant Journal* **69**, 289–301.
- Grover A. (1993). How do senescing leaves lose photosynthetic activity. *Current Science* **64**, 226–233.
- Guo Y., Ren G., Zhang K., Li Z., Miao Y., Guo H. (2021). Leaf senescence: progression, regulation, and application. *Molecular Horticulture* **1**, 5.
- Hejny S., Slavík B., Kirschner J., Křisa B. (2003). Květena České republiky 3. Academia, Praha.
- Hensel L.L., Nelson M.A., Richmond T.A. et al (1994). The fate of inflorescence meristems is controlled by developing fruits in Arabidopsis. *Plant Physiology* **106**, 863–876.
- Hörtensteiner S. (2006). Chlorophyll degradation during senescence. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 55–77.
- Huala E., Oeller P.W., Liscum E., Han I.S., Larsen E., Briggs W.R. (1997). Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**, 2120–2123.
- Huang W., Chen Q., Zhu Y., Hu F., Zhang L., Ma Z., He Z., Huang J. (2013). Arabidopsis thylakoid formation 1 is a critical regulator for dynamics of PSII–LHCII complexes in leaf senescence and excess light. *Molecular Plant* **6**, 1673–1691.
- Chen Y.E., Ma J., Wu N., Su Y.Q., Zhang Z.W., Yuan M., Zhang H.Y., Zeng X.Y. (2018). The roles of Arabidopsis proteins of Lhcb4, Lhcb5 and Lhcb6 in oxidative stress under natural light conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* **130**, 267–276.
- Chen Y., Yamori W., Tanaka A., Tanaka R., Ito H. (2021). Degradation of the photosystem II core complex is independent of chlorophyll degradation mediated by Stay-Green Mg<sup>2+</sup> dechelataase in Arabidopsis. *Plant Science* **307**, 110902.
- Chrobok D. (2018). To “leaf” or not to “leaf”. Understanding the metabolic adjustments associated with leaf senescence. Doctoral thesis. Umeå University, Sweden.
- Ilíková I., Ilík P., Opatíková M., Arshad R., Nosek L., Karlický V., Kučerová Z., Roudnický P., Pospíšil P., Lazár D., Bartoš J., Kouřil R. (2021). Towards spruce-type photosystem II: consequences of the loss of light-harvesting proteins LHCB3 and LHCB6 in Arabidopsis. *Plant Physiology* **187**, 2691–2715.
- Janečková H., Husičková A., Ferretti U., Prčina M., Pilařová E., Plačková L., Pospíšil P., Doležal K., Špundová M. (2018). The interplay between cytokinins and light during senescence in detached Arabidopsis leaves. *Plant, Cell & Environment* **41**, 1870–1885.
- Johnson M.P. (2016). Photosynthesis. *Essays in Biochemistry* **60**, 255–273.
- Kar M., Streb P., Hertwig B., Feierabend J. (1993). Sensitivity to photodamage increases during senescence in excised leaves. *Journal of Plant Physiology* **141**, 538–544.

- Keech O., Pesquet E., Ahad A., Askne A., Nordvall D., Vodnala S.M., Tuominen H., Hurry V., Dizengremel P., Gardeström P. (2007). The different fates of mitochondria and chloroplasts during dark-induced senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant, Cell & Environment* **30**, 1523–1534.
- Kim J., Kim J.H., Lyu J.I., Woo H.R., Lim P.O. (2018). New insights into the regulation of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **69**, 787–799.
- Kirchhoff H., Haase W., Wegner S., Danielsson R., Ackermann R., Albertsson P. A. (2007). Low-light-induced formation of semicrystalline photosystem II arrays in higher plant chloroplasts. *Biochemistry* **46**, 11169–11176.
- Kirchhoff H. (2013). Architectural switches in plant thylakoid membranes. *Photosynthesis Research* **116**, 481–487.
- Klimmek, F., Sjödin, A., Noutsos, C., Leister, D., and Jansson, S. (2006). Abundantly and rarely expressed Lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants. *Plant Physiology* **140**, 793–804.
- Klughammer C., Schreiber U. (2008). Saturation pulse method for assessment of energy conversion in PS I. *The PAM Application Notes* **1**, 11–14.
- Kouřil R., Nosek L., Bartoš J., Boekema E.J., Ilík P. (2016). Evolutionary loss of light-harvesting proteins Lhcb6 and Lhcb3 in major land plant groups – break-up of current dogma. *New Phytologist* **210**, 808–814.
- Kouřil R., Wientjes E., Bultema J.B., Croce R., Boekema E.J. (2013). High-light vs. low-light: Effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* **1827**, 411–419.
- Kovács L., Damkjær J., Kerešiče S., Iliaia C., Ruban A.V., Boekema E.J., Jansson S., Horton P. (2006). Lack of the light-harvesting complex CP24 affects the structure and function of the grana membranes of higher plant chloroplasts. *The Plant Cell* **18**, 3106–3120.
- Krämer U. (2015). The natural history of model organisms: planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife* **4**, e06100.
- Kuai B., Chen J., Hörtensteiner S. (2018). The biochemistry and molecular biology of chlorophyll breakdown. *Journal of Experimental Botany* **69**, 751–767.
- Lazár D. (2015). Parameters of photosynthetic energy partitioning. *Journal of Plant Physiology* **175**, 131–147.
- Li X.P., Björkman O., Shih C., Grossman A.R., Rosenquist M., Jansson S., Niyogi K.K. (2000). A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **403**, 391–395.
- Lim P.O., Kim H.J., Nam H.G. (2007). Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 115–136.

- Malnoë A. (2018). Photoinhibition or photoprotection of photosynthesis? Update on the (newly termed) sustained quenching component qH. *Environmental and Experimental Botany* **154**, 123–133.
- Maxwell K., Johnson G. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**, 659–668.
- Mik V., Szüčová L., Šmehilová M., Zatloukal M., Doležal K., Nisler J., Grúz J., Galuszka P., Strnad M., Spíchal L. (2011). N9-substituted derivatives of kinetin: Effective antisenesescence agents. *Phytochemistry* **72**, 821–831.
- Misra A. N., Misra M., Singh R. (2012). Chlorophyll fluorescence in plant biology. In: *Biophysics*, 171–192.
- Müller P., Li X. P., Niyogi K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* **125**, 1558–1566.
- Nelson N., Ben-Shem A. (2005). The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature reviews. Molecular and Cell Biology* **5**, 971–982.
- Noodén L.D. (1988). The phenomena of senescence and aging. In: *Senescence and aging in plants*. Academic Press, 1–50.
- Noodén L., Guiamet J.J., John I. (1997). Senescence mechanism. *Physiologia Plantarum* **101**, 746–753.
- Nosek L. (2017). Structural characterization of photosynthetic supercomplexes in plants. *Disertační práce*. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Pagliano C., Saracco G., Barber J. (2013). Structural, functional and auxiliary proteins of Photosystem II. *Photosynthesis Research* **116**, 167–188.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol. (1998). *Fyziologie rostlin*. Academia Praha.
- Procházková D., Wilhelmová N. (2004). Changes in antioxidative protection in bean cotyledons during natural and continuous irradiation-accelerated senescence. *Biologia Plantarum* **48**, 33–39.
- Ríos J.J., Pérez-Gálvez A., Roca M. (2014). Non-fluorescent chlorophyll catabolites in quince fruits. *Food Research International* **65**, 255–262.
- Roháček K. a Barták M. (1999). Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* **37**, 339–363.
- Roháček K. (2002). Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* **40**, 13–29.

- Rosiak-Figielek B. a Jackowski G. (2000). The disappearance kinetics of Lhcb polypeptides during dark-induced senescence of leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**, 245–251.
- Sakuraba Y., Jeong J., Kang M.Y., Kim J., Paek N.CH., Choi G. (2014). Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in *Arabidopsis*. *Nature Communications* **5**, 4636.
- Sane P.V., Ivanov A., Öquist G., Hüner N. (2012). Thermoluminescence. photosynthesis: plastid biology, energy conversion and carbon assimilation. *Advances in Photosynthesis and Respiration* **34**, 445–474.
- Serôdio J., Schmidt W., Frankenbach S. (2017). A chlorophyll fluorescence-based method for the integrated characterization of the photophysiological response to light stress. *Journal of Experimental Botany* **68**, 1123–1135.
- Shi, L.X., Schroder, W.P. (2004). The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II. *Biochimica Et Biophysica Acta – Bioenergetics* **1608**, 75–96.
- Schwarz E.M., Tietz S., Froehlich, J.E. (2018). Photosystem I-LHCII megacomplexes respond to high light and aging in plants. *Photosynthesis Research* **136**, 107–124.
- Sobieszczuk-Nowicka E., Wrzesiński T., Bagniewska-Zadworna A., Kubala S., RucińskaSobkowiak R., Polcyn W., Misztal L., Mattoo A.K. (2018). Physiogenetic dissection of dark induced leaf senescence and timing its reversal in barley. *Plant Physiology* **178**, 654–671.
- Song Y., Yang C., Gao S., Zhang W., Li L., Kuai B. (2014). Age-triggered and dark-induced leaf senescence require the bHLH transcription factors PIF3, 4, and 5. *Molecular Plant* **7**, 1776–1787.
- Špundová M., Popelková H., Ilík P., Skotnica J., Novotný R., Nauš J. (2003). Ultra-structural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescing under dark and light conditions. *Journal of Plant Physiology* **160**, 1051–1058.
- Špundová M., Slouková K., Hunková M., Nauš J. (2005a). Plant shading increases lipid peroxidation and intensifies senescence-induced changes in photosynthesis and activities of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in wheat. *Photosynthetica* **43**, 403–409.
- Špundová M., Strzalka K., Nauš J. (2005b). Xanthophyll cycle activity in detached barley leaves senescing under dark and light. *Photosynthetica* **43**, 117–124.
- Špundová M. (2019). Leaf senescence as a light-dependent process. Habilitační práce. Masarykova univerzita.
- Tamary E., Nevo R., Naveh L., Levin-Zaidman S., Kiss V., Savidor A., Levin Y., Eyal Y., Reich Z., Adam Z. (2019). Chlorophyll catabolism precedes changes in chloroplast structure and proteome during leaf senescence. *Plant Direct* **3**, 1–18.

- Tanksley S.D. (2004). The genetic, developmental, and molecular base of fruit size and shape variation in tomato. *The Plant Cell* **16**, 181–189.
- Townsend A.J., Saccon F., Giovagnetti V., Wilson S., Ungerer P., Ruban A.V. (2018). The causes of altered chlorophyll fluorescence quenching induction in the Arabidopsis mutant lacking all minor antenna complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* **1859**, 666–675.
- Vlčková A., Špundová M., Kotabová E., Novotný R., Doležal K., Nauš J. (2006). Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiologia Plantarum* **126**, 257–267.
- Wang, J., Leister, D., Bolle, C. (2015). Photosynthetic lesions can trigger accelerated senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **66**, 6891–6903.
- Weaver L.M., Amasino R.M. (2001). Senescence is induced in individually darkened Arabidopsis leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology* **127**, 876–886.
- Wei, X.P., Su, X.D., Cao, P., Liu, X.Y., Chang, W.R., Li, M., Zhang, X.Z., and Liu, Z.F. (2016). Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3.2 angstrom resolution. *Nature* **534**, 69–74.
- Woo H.R., Kim H.J., Nam H.G., Lim P.O. (2013). Plant leaf senescence and death – regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *Journal of Cell Science* **126**, 4823–4833.
- Woo H.R., Kim H.J., Lim P.O., Nam H.G. (2019). Leaf senescence: systems and dynamics aspects. *Annual Review of Plant Biology* **70**, 347–376.
- Xia Q., Tan J., Cheng S., Jiang Y., Guo Y. (2019). Sensing plant physiology and environmental stress by automatically tracking  $F_j$  and  $F_i$  features in PSII chlorophyll fluorescence induction. *Photochemistry and Photobiology* **95**, 1495–1503.
- Yang Y.N., Safarova R.B., Park S.Y., Sakuraba Y., Oh M.H., Zulfugarov I.S., Lee Ch.B., Tanaka A., Paek NCH., Lee CHH. (2019). Chlorophyll degradation and light-harvesting complex II aggregate formation during dark-induced leaf senescence in Arabidopsis pheophytinase mutants. *Journal of Plant Biology* **62**, 27–38.
- Zelisko A., Jackowski G. (2004). Senescence-dependent degradation of Lhcb3 is mediated by a thylakoid membrane-bound protease. *Journal of Plant Physiology* **161**, 1157–1170.